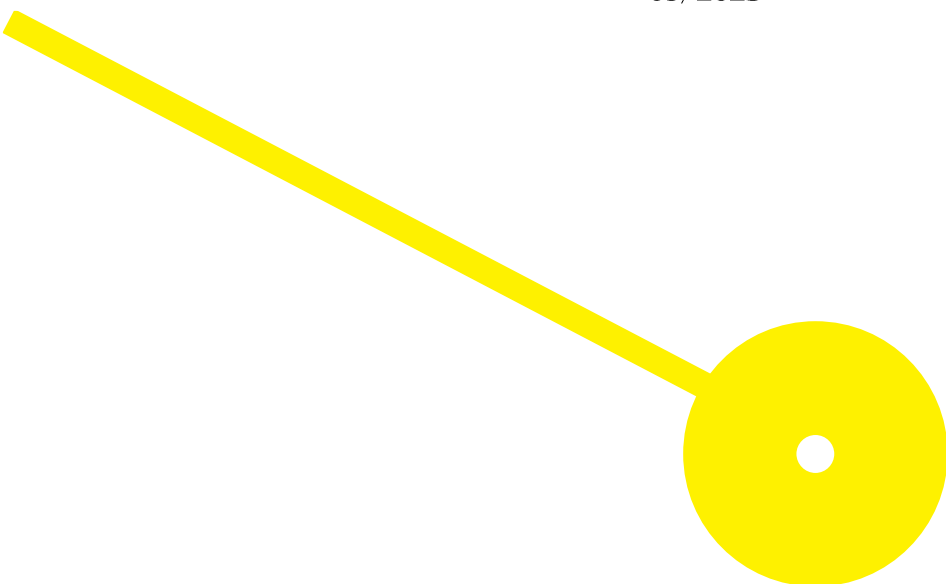




Vias moleculares comuns ligadas às doenças pulmonares intersticiais com fenótipo fibrosante progressivo: o papel da variante promotora ***MUC5B***

Melany Patricia Furtado Gonçalves

09/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



FIBRALUNG
FIBROSING INTERSTITIAL
LUNG DISEASES

**Vias moleculares comuns ligadas às doenças pulmonares intersticiais com fenótipo
fibrosante progressivo: o papel da variante promotora *MUC5B***

Autor

Melany Patricia Furtado Gonçalves

Orientador(es)

Doutora Ana Rita Faria dos Santos

Instituto de Investigação e Inovação em Saúde

Prof. Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Área de Especialização em Patologia Molecular pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Menção de apoio financeiro

Relatório de Estágio realizado com o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. (FCT), no âmbito do projeto PTDC/MEC-RES/0158/2020 e da bolsa atribuída pela fundação Amélia de Mello e D. José de Mello.



Durante a execução dos trabalhos descritos neste relatório, o autor apresentou publicamente parte do trabalho:

- Apresentação do poster intitulado *“Unveiling common molecular pathways linked to ILDs with progressive fibrosing phenotype: the role of MUC5B promoter variant”* no I Congresso BioMedLab, que decorreu nos dias 10, 11 e 12 de março de 2023, no Centro de Congressos Alfândega do Porto – Anexo I

- Apresentação do poster intitulado *“Unveiling common molecular pathways linked to ILDs with progressive fibrosing phenotype: the role of MUC5B promoter variant”* no IJUP’23 – 16º Encontro de Investigação Jovem da Universidade do Porto, que decorreu nos dias 10, 11 e 12 de maio de 2023, na Reitoria da Universidade do Porto – Anexo II

Agradecimentos

O meu mestrado em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia na área de especialização em Patologia Molecular foi uma longa caminhada, com altos e baixos, neste culminar de dois anos de muito trabalho e dedicação e é com grande satisfação que termino esta importante etapa da minha vida. Não poderia deixar de expressar a minha gratidão para com as pessoas que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, por todas as oportunidades concedidas, pela força nos momentos de fraqueza e dificuldades.

Gostaria de agradecer a minha mãe Helena Mendonça e a minha madrinha Sara Tavares, sem elas era impossível. Obrigada por me ensinarem tudo o que sei hoje, obrigada por me ajudarem a superar e a gerir todas as minhas dificuldades, obrigada por todas as lutas e desafios enfrentados para me concederem esta oportunidade de estudar em Portugal com o intuito sempre de proporcionar um futuro brilhante.

Aos meus irmãos Dúnia Gonçalves, Nádia Gonçalves e Ledmir Gonçalves obrigada pelo amor, carinho, apoio e motivação que sempre me deram.

Um especial agradecimento à minha orientadora Rita Santos, pela atenção, carinho e principalmente pelas orientações e por todo o auxílio na realização deste trabalho. Estando sempre disponível a me ajudar a evoluir profissionalmente.

À minha co-orientadora, Regina Silva por toda a disponibilidade e orientação demonstrada no decorrer deste projeto.

Gostaria de agradecer também o i3S, em especial o grupo *immune regulation* e os profissionais do Centro Hospitalar Universitário de São João, onde realizei o meu estágio, obrigada por me proporcionarem um ambiente acolhedor de troca de experiências e aprendizado. Estou verdadeiramente grata pela oportunidade de trabalhar ao lado de profissionais dedicados.

Às minhas amigas Adriana Moniz, Diana Semedo, Liliane Mendes e Jussara Spencer por todo o apoio dado nestes últimos anos e também as amigas que a ESS e o i3S me trouxeram, a Petra Tacks, Ana Bessa e Andreia Coelho, fizeram parte deste percurso, partilhamos momentos em aulas, trabalhos de grupo, festas e convívios, sem vocês não tinha mesmo sabor.

Ao meu namorado Milton Lopes, meu companheiro de todas as horas, obrigada por estar sempre do meu lado, dando apoio e puxões de orelha quando preciso e torcer sempre para o meu sucesso.

Aos meus familiares que estiveram comigo neste percurso torcendo para a minha vitória. Espero ser um grande orgulho para eles.

Resumo

As doenças pulmonares intersticiais com fenótipo fibrosante progressivo (DPIs-FP) compreendem um grupo heterogêneo de doenças pulmonares associadas a alta morbidade e mortalidade. Entre os DPIs-FP estão a fibrose pulmonar idiopática (FPI) e a pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica, a genética do hospedeiro e diferentes gatilhos ambientais desencadeiam uma resposta imunológica não controlada que pode culminar numa fibrose autossustentada. O polimorfismo de nucleótido único rs35705950 do gene *MUC5B* é a variante genética comum associada a maior risco de desenvolvimento de FPI. Neste trabalho caracterizamos o papel desta variante no desenvolvimento das DPIs-FP, nomeadamente, da PH fibrótica e, como grupo comparador, da FPI. Observamos que na nossa coorte a frequência do alelo menor está drasticamente aumentada em pacientes com FPI e PH fibrótica. Adicionalmente, a expressão da proteína MUC5B está aumentada no parênquima pulmonar. Surpreendentemente, nos casos de PH fibrótica este aumento parece ser ainda mais acentuado nos indivíduos portadores do alelo menor, associando, também, a um aumento da frequência de macrófagos no lavado broncoalveolar. A nossa extensa coorte de doentes permite-nos aprofundar a caracterização destas patologias de forma a descodificar vias fibroproliferativas comuns e potenciais *scores* de risco que nos ajudem a, precocemente, identificar um paciente com capacidade de progressão.

Palavras-chave: Doença pulmonar intersticial; pneumonite de hipersensibilidade; fibrose pulmonar idiopática; MUC5B; macrófagos alveolares.

Abstract

Progressive fibrosing ILDs (PF-ILDs) comprise a heterogeneous group of lung diseases associated with high morbidity and mortality. PF-ILDs include idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and fibrotic hypersensitivity pneumonitis (HP), involving complex interactions between host genetics and different environmental triggers, shaping the immune milieu that ultimately drives the fibrotic cascade in a susceptible patient. *MUC5B* single nucleotide polymorphism (SNP) rs35705950 is the common genetic variant associated with the highest risk of developing IPF. The main goal of this study is to characterize the role of the rs35705950 SNP in the common molecular pathways linked to PF-ILDs, namely in fibrotic HP, comparing with IPF patients. So far, we observed a dramatically increased in the frequency of GT and TT genotypes in IPF and fibrotic HP in comparison with healthy controls. Additionally, increased MUC5B protein expression in lung is observed in IPF and fibrotic HP patients. Interestingly, fibrotic HP T-allele carriers seems to have even higher levels of MUC5B protein than GG patients, linked to an increased frequency of macrophages in bronchoalveolar lavage fluid. With this methodology we hope to unveil the shared pathways between IPF and fibrotic HP to improve the prognosis and patients' quality of life of patients.

Keywords: Interstitial lung disease; hypersensitivity pneumonitis; idiopathic pulmonary fibrosis; MUC5B; alveolar macrophages.

Índice

1. Doenças Pulmonares Intersticiais	1
1.1. DPI com fenótipo fibrosante progressivo	2
1.2. Fibrose pulmonar idiopática	5
1.3. Pneumonite de hipersensibilidade	6
1.4. Predisposição genética – importância do gene <i>MUC5B</i> nas DPIs	9
1.5. Contextualização e objetivo	11
2. Metodologia.....	12
2.1. Participantes e desenho do estudo.....	12
2.2. Implicações Éticas e legais.....	13
2.3. Colheita de amostras biológicas e contagem celular no LBA	13
2.4. Extração de DNA e genotipagem da variante na região promotora do gene <i>MUC5B</i> (SNP rs35705950).....	13
2.5. Imunohistoquímica.....	14
2.6. Quantificação da área positiva para <i>MUC5B</i>	14
2.7. Análise estatística.....	14
3. Resultados	15
3.1. Pneumonite de hipersensibilidade é a patologia com maior incidência na coorte de pacientes do FIBRALUNG.....	15
3.2. A frequência das diferentes populações de células imunes em lavados broncoalveolares de pacientes com PH fibrótica e FPI é comparável.....	16
3.3. Frequência do alelo menor do SNP rs35705950 encontra-se aumentada em doentes com pneumonite de hipersensibilidade fibrótica	17
3.4. <i>MUC5B</i> apresenta expressão aumentada em doentes com FPI e PH fibrótica.....	19
3.5. Estratificação dos doentes com PH fibrótica de acordo com o seu genótipo para o SNP rs35705950 revela uma possível função dos macrófagos no desenvolvimento/manutenção da doença.....	20
4. Conclusão e perspectivas futuras.....	25
5. Referências Bibliográficas.....	26
Anexos	30
Anexo I: Poster apresentado no I Congresso BioMedLab, março de 2023, Porto	31
Anexo II: Poster apresentado na 16ª edição do Encontro de Investigação Jovem da U. Porto (IJUP), maio de 2023, Porto	32

Índice de Figuras

Figura 1. Classificação das doenças pulmonares intersticiais proposta pela <i>European Respiratory Society</i> (ERS) conjuntamente com a <i>American Thoracic Society</i> (ATS).....	1
Figura 2. Representação esquemática de doenças pulmonares intersticiais que podem desenvolver um fenótipo fibrosante progressivo durante o curso da doença.....	3
Figura 3. Mecanismos envolvidos na patogénese e progressão das doenças pulmonares intersticiais com fenótipo progressivo fibrosante	4
Figura 4. Imunopatogénese da pneumonite de hipersensibilidade	8
Figura 5. Comparação entre a fibrose pulmonar idiopática e a pneumonite de hipersensibilidade	9
Figura 6. Espectro de variantes genéticas conhecidas associadas a um o risco aumentado de desenvolver FPI e as suas frequências alélicas relativas e efeito	10
Figura 7. Caracterização da amostragem em estudo.....	12
Figura 8. Distribuição, de acordo com o diagnóstico, dos pacientes incluídos na coorte FIBRALUNG	16
Figura 9. Populações celulares presentes no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica e fibrose pulmonar idiopática (FPI) apresentam uma distribuição semelhante.....	17
Figura 10. SNP rs35705950 da região promotora do gene <i>MUC5B</i> está associado com a incidência de fibrose pulmonar idiopática e de pneumonite de hipersensibilidade fibrótica.....	18
Figura 11. Expressão da proteína MUC5B encontra-se muito aumentada no tecido pulmonar de doentes com fibrose pulmonar idiopática (FPI) e pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica.....	20
Figura 12. Expressão de MUC5B aumentada em pacientes com pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica portadores do alelo T	22
Figura 13. Indivíduos portadores de alelo T possuem um aumento da frequência de macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA)	24

Lista de abreviaturas

APCs: Células apresentadoras de antígenos

ATS: *American Thoracic Society*

BSA: Albumina sérica de bovino

CTD–ILDs: Doença pulmonar intersticial associada à doença do tecido conjuntivo

CVF: Capacidade vital forçada

DAB: 3, 3'–Diaminobenzidina

DPI: Doença pulmonar intersticial

DPI–FP: Doença pulmonar intersticial fibrosante progressiva

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra–acético

EMA: *European Medicines Agency*

ERS: *European Respiratory Society*

FDA: *Food and Drug Administration*

FPI: Fibrose pulmonar idiopática

g/f PF: Fibrose pulmonar familiar

IFN γ : Interferão gama

IL: Interleucina

Insip: Pneumonia intersticial idiopática inespecífica

IPAF: Doença pulmonar intersticial secundárias as doenças autoimunes

JRS: *Japanese Respiratory Society*

LAM: Linfangioleiomiomatose

LATA: *Latin American Thoracic Association*

LBA: Lavado broncoalveolar

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MUC5B: Mucina 5B

PH: Pneumonite de hipersensibilidade

PRR: Recetores de reconhecimento padrão

SD: Desvio padrão

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

TCAR: Tomografia computadorizada de alta resolução

uILD: Doença pulmonar intersticial inclassificável

UIP: Pneumonia intersticial usual

1. Doenças Pulmonares Intersticiais

As doenças pulmonares intersticiais (DPIs) compreendem um grupo heterogêneo de distúrbios pulmonares parenquimatosos difusos, que se sobrepõem nas suas apresentações clínicas e padrões de lesão pulmonar, associadas a uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade (1, 2). Compreendem um grupo de mais de 200 doenças pulmonares, sendo a maioria classificada como rara. Compartilham múltiplas características clínicas e fisiopatológicas, no entanto a sua etiologia e prognóstico podem ser diversos (3-5).

Em 2002, a *European Respiratory Society* (ERS) conjuntamente com a *American Thoracic Society* (ATS), propuseram uma classificação para as DPIs, sendo estas divididas em quatro grupos principais de acordo com o adaptado na Figura 1 (6).

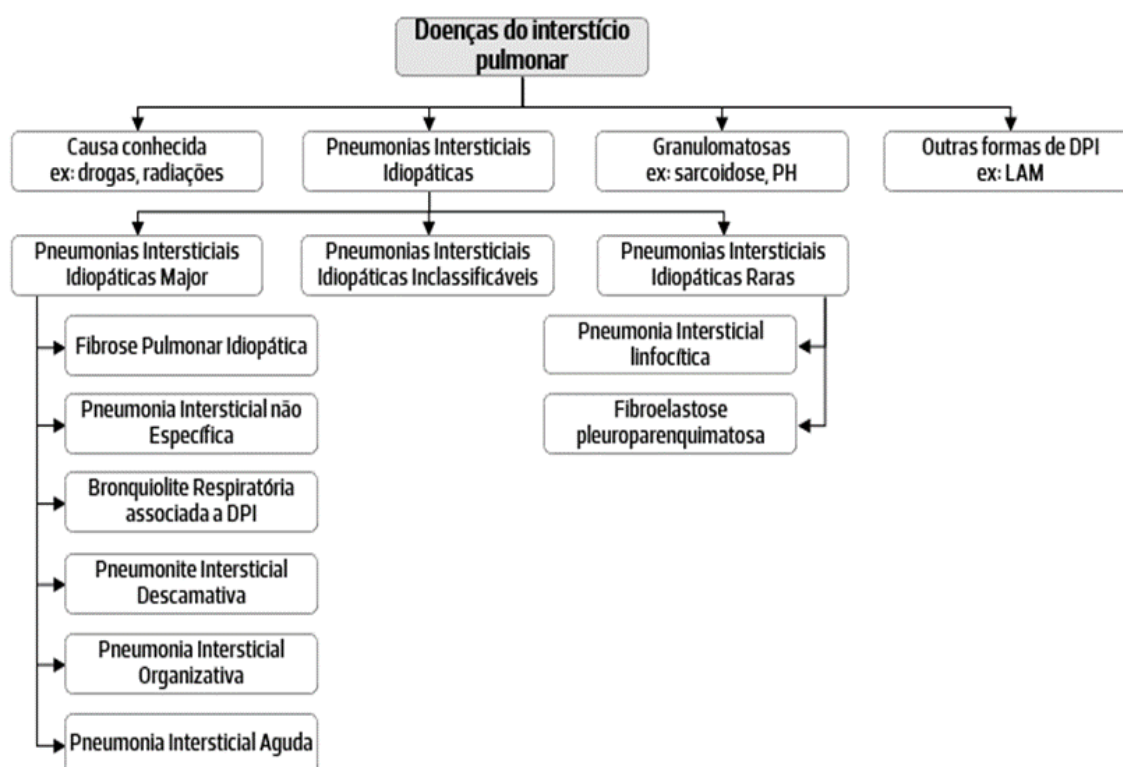


Figura 1. Classificação das doenças pulmonares intersticiais proposta pela *European Respiratory Society* (ERS) conjuntamente com a *American Thoracic Society* (ATS). Adaptado de (6). Classificação das doenças pulmonares intersticiais (DPIs) tendo em conta a sua etiologia, características e outras formas inclassificáveis. PH: pneumonite de hipersensibilidade; LAM: linfangioleiomiomatose.

Neste grupo de doenças, a fibrose pulmonar idiopática (FPI), a sarcoidose, a pneumonia intersticial idiopática e a pneumonite de hipersensibilidade (PH) são responsáveis pela maioria dos casos de DPI (7). Os fatores de risco associados a estas patologias são múltiplas e incluem fatores genéticos, predisposição a outras doenças, exposições ambientais e outras causas desconhecidas e de contextos etiológicos ainda pouco esclarecidos (1).

As manifestações clínicas são geralmente inespecíficas, incluindo tosse, dispneia progressiva e hipoxemia arterial (3). O facto da sintomatologia ser inespecífica dificulta o diagnóstico diferencial, sendo necessário uma análise e discussão multidisciplinar com recurso a parâmetros clínicos, funcionais, radiológicos e, muitas vezes, histopatológicos (8, 9). A imagiologia é uma ferramenta fundamental na deteção precoce, diagnóstico e monitorização das DPIs. A tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) do tórax é considerada uma técnica essencial para o processo de diagnóstico e seguimento, permitindo a obtenção de imagens altamente detalhadas (10-12). A principal característica observada nas DPIs, consiste na presença de infiltrado pulmonar difuso observado nos exames de imagiológicos, que é evidente em pelo menos 90% dos pacientes (13).

Relativamente à sua prevalência, esta não está bem elucidada, uma vez que existe uma grande heterogeneidade no diagnóstico clínico final. No entanto, estima-se que a prevalência global das doenças pulmonares intersticiais seja de até 76,0 casos por 100.000 pessoas na Europa e 74,3 casos por 100.000 nos Estados Unidos (14).

1.1. DPI com fenótipo fibrosante progressivo

As doenças pulmonares intersticiais apresentam uma vasta amplitude de fenótipos desde unicamente inflamatórias e, pelo menos até certa extensão, reversíveis, até à manifestação de um perfil fibrótico, estabelecido, e com grande impacto na função e declínio das trocas gasosas (4, 15). A presença de fibrose é muitas vezes usada como um indicador de progressão da doença e está associada a pior prognóstico (3). A fibrose do parênquima pulmonar pode progredir de forma autossustentada levando a uma deterioração da função pulmonar, agravamento dos sintomas respiratórios e impacto na qualidade de vida, aumentando o risco de morte precoce (16, 17).

A terminologia recentemente utilizada para descrever pacientes com DPI que podem apresentar fenótipo fibrosante progressivo é "DPI fibrosante progressiva (DPI-FP)" (4). Esse fenótipo é definido como uma síndrome clínica que partilha características genéticas e patofisiológicas com a fibrose pulmonar idiopática (4) que é por definição uma doença fibrosante progressiva. Estas patologias caracterizam-se por um rápido e progressivo agravamento dos sintomas respiratórios, declínio da função pulmonar, resistência a terapias imunomoduladoras, diminuição de qualidade de vida e mortalidade precoce (3, 18). Certos tipos de DPIs, além da FPI, apresentam maior probabilidade de desenvolver um fenótipo progressivo durante o curso da doença, tais como a pneumonia intersticial idiopática inespecífica, DPIs inclassificável, DPIs secundárias as doenças autoimunes, pneumonite de hipersensibilidade, fibrose pulmonar familiar, entre outras identificadas na Figura 2 (3, 19).

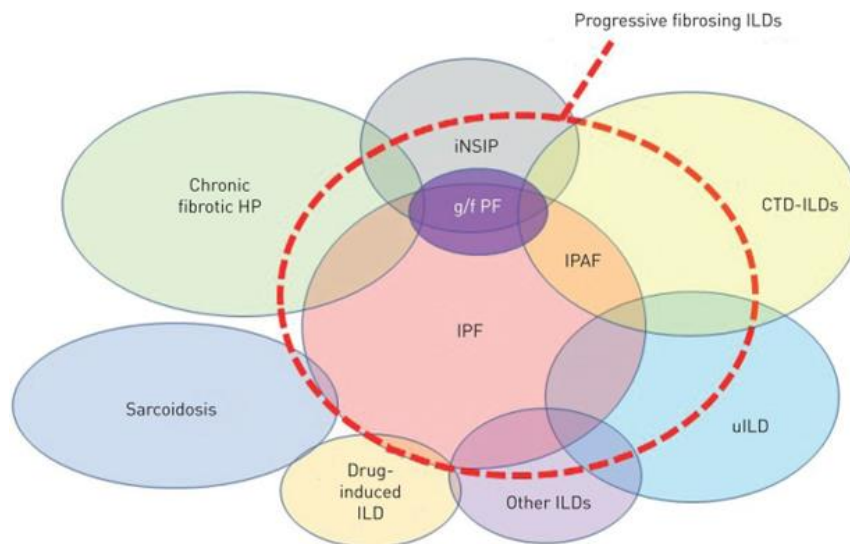


Figura 2. Representação esquemática de doenças pulmonares intersticiais que podem desenvolver um fenótipo fibrosante progressivo durante o curso da doença (1). A percentagem de casos dentro de cada classe de doença pulmonar intersticial que apresenta este fenótipo está delimitada pelas linhas tracejadas a vermelho, sendo a fibrose pulmonar idiopática o protótipo da doença pulmonar fibrosante progressiva, apresentando, na totalidade dos casos, um curso fibrótico progressivo. Em parte, as restantes patologias podem ou não ser continuamente fibróticas progressivas. IPF: fibrose pulmonar idiopática; *Chronic fibrotic HP*: pneumonite de hipersensibilidade crónica; CTD-ILDs: doença pulmonar intersticial associada à doença do tecido conjuntivo; iNSIP: pneumonia intersticial idiopática inespecífica; g/f PF: fibrose pulmonar familiar; IPAF: doença pulmonar intersticial secundárias as doenças autoimunes; Sarcoidoses; Outras doenças pulmonares intersticiais relacionadas à exposição (asbestose e silicose); uILD: doença pulmonar intersticial inclassificável.

Estudos indicam que 18 a 32% dos pacientes diagnosticados com DPIs não-FPI desenvolveram um fenótipo fibrosante progressivo, tendo experienciado um atraso significativo na deteção deste fenótipo e administração de tratamento adequado (2, 15, 16). Conhecer as vias fibroproliferativas partilhadas por estas patologias irá permitir um diagnóstico mais rápido e, consequentemente, uma intervenção clínica atempada o que terá um grande impacto na qualidade de vida destes pacientes.

Existem vários mecanismos envolvidos na patogénese e progressão das DPIs fibrosantes. Acredita-se que as DPIs-FP sejam desencadeadas por lesões epiteliais ou vasculares crónicas repetitivas, ou por inflamação granulomatosa, que levam à destruição celular e falha no processo de reparação e regeneração (17).

Os fibroblastos, as principais células efetoras nas DPI fibróticas, são recrutados de diferentes locais para os locais da lesão (18). Estes são ativados para se tornarem miofibroblastos levando a um depósito excessivo de proteínas de matriz extracelular e consequente impacto na função alveolar. Além disso, macrófagos e linfócitos são recrutados para o local da lesão e libertam mediadores pró-fibróticos que promovem um *loop* positivo para uma ativação continuada dos fibroblastos – fibrose autossustentada (Figura 3) (19, 20).

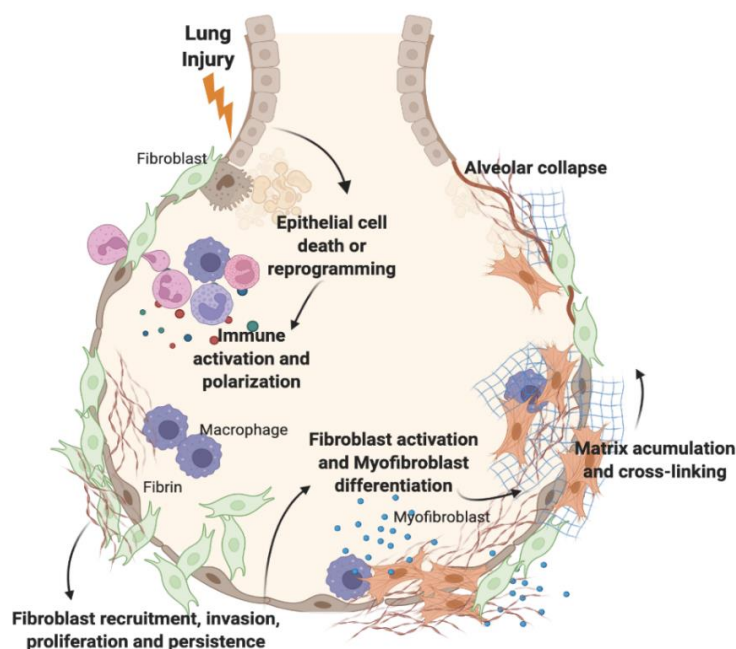


Figura 3. Mecanismos envolvidos na patogênese e progressão das doenças pulmonares intersticiais com fenótipo progressivo fibrosante. Aquando da existência de lesões epiteliais ou vasculares crônicas repetitivas de etiologia variada a homeostasia do parênquima pulmonar é quebrada. As células locais são reprogramadas, secretam fatores com função quimiotática que irão recrutar diferentes células, nomeadamente macrófagos e células precursoras de fibroblastos e inicia-se um *loop* positivo que irá sustentar a diferenciação e ativação continuada dos fibroblastos. Estes fatores pró-fibróticos contribuem para a sua diferenciação em miofibroblastos, levando a uma acumulação excessiva de matriz extracelular. Fonte: Imagem de Rita F. Santos criada com *BioRender.com*.

Após o diagnóstico, os doentes devem ser avaliados e monitorizados regularmente de forma a ajustar a terapêutica sempre que necessário. Para o tratamento de DPLs induzidas por inflamação são frequentemente administrados corticosteroides, nomeadamente a prednisona, bem como o micofenolato de mofetil, a azatioprina e o metotrexato como terapia de primeira linha devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (13, 21). Por outro lado, DPLs caracterizadas por um fenótipo predominantemente fibrótico, têm sido tratadas com fármacos antifibróticos (nintedanib ou pirfenidona), aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA), uma vez que retardam a progressão da doença, atuando na redução do declínio anual da função pulmonar avaliada pela capacidade vital forçada (CVF), com o intuito de melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes (14, 22–24). As semelhanças existentes entre as DPLs que podem desenvolver um fenótipo fibrosante progressivo durante o curso da doença sugerem uma via comum de tratamento (4). No entanto, são necessários mais estudos para melhor conhecer e compreender estas doenças.

Este trabalho foca-se na caracterização da pneumonite de hipersensibilidade fibrótica, DPI mediada imunologicamente, resultante de uma exposição prolongada e exagerada a um determinado antígeno ambiental (de etiologia conhecida ou não) (25). Esta patologia é caracterizada por reações de hipersensibilidade de tipo III e IV que causam dano continuado no ambiente pulmonar, levando à

destruição da arquitetura e condicionando as trocas gasosas. No entanto, esta é uma patologia de baixa incidência em termos globais e cujos mecanismos de progressão são ainda pouco conhecidos. Dessa forma, usaremos como grupo comparador a fibrose pulmonar idiopática, que é a DPI com fenótipo fibrótico mais extremo, tendo sido extensamente estudada ao longo dos anos.

1.2. Fibrose pulmonar idiopática

A fibrose pulmonar idiopática é uma pneumonia intersticial crônica, progressiva, fibrosante, de etiologia desconhecida, definida pelo padrão histopatológico e/ou radiológico da pneumonia intersticial usual (UIP) (14, 26, 27). Nos exames histológicos são frequentemente observadas regiões císticas com um padrão em favo de mel, uma estrutura que contém acúmulo denso de componente mucoide, geralmente localizado na região subpleural e em áreas densamente fibróticas. Essas estruturas císticas são frequentemente revestidas por epitélio colunar pseudoestratificado ciliado e epitélio alveolar constituído por células epiteliais alveolares tipo 2 (28, 29).

Esta patologia apresenta mau prognóstico, apesar das terapias recentemente aprovadas, os doentes com FPI apresentam uma sobrevida média de 3 a 5 anos após o diagnóstico (30, 31).

A fibrose pulmonar idiopática afeta principalmente indivíduos do sexo masculino, com idade superior a 60 anos (14, 32, 33) e os principais sintomas incluem tosse seca, falta de ar, cansaço, fadiga, perda de apetite, perda de peso e frequentemente hipocromatismo digital. Os doentes podem apresentar evoluções distintas, em alguns casos permanecem relativamente estáveis ao longo dos anos, progredindo lentamente, ao passo que em outros podem apresentar uma progressão mais rápida da doença. Uma minoria dos doentes apresenta agravamento marcado e súbito dos sintomas (exacerbação aguda), sendo a forma associada ao pior prognóstico (34).

Relativamente à incidência e prevalência, estas são difíceis de avaliar devido à evolução dos critérios de diagnóstico e à heterogeneidade metodológica dos estudos realizados (27). Dados epidemiológicos mostram que a incidência de FPI é mais comum na América do Norte e na Europa com cerca de 3 a 9 casos por 100.000 pessoas por ano, comparativamente ao verificado na América do Sul e no Este Asiático com uma incidência de menos de 4 casos por 100.000 pessoas por ano (35). Nos Estados Unidos, a prevalência de FPI tem sido relatada como variando de 10 a 60 casos por 100.000 pessoas (36).

Embora a fibrose pulmonar idiopática seja, por definição, uma doença de etiologia desconhecida, uma série de possíveis fatores de risco foram descritos como estando associados a uma maior suscetibilidade para desenvolver a doença, tais como fatores externos (exposições ambientais/ocupacionais, tabagismo, refluxo gastroesofágico, infecções recorrentes) bem como fatores ligados ao próprio hospedeiro – predisposição genética (32).

Exposições sucessivas a fatores de risco num indivíduo geneticamente predisposto levam a um dano do epitélio alveolar, seguido de um processo de reparação anormal, proliferação descontrolada e

desorganizada de miofibroblastos que leva à distorção gradual da arquitetura pulmonar. Os miofibroblastos derivam principalmente da diferenciação de células mesenquimais pulmonares residentes (como fibroblastos residentes) e acumulam-se, posteriormente, nos locais alveolares que foram alvo de lesão, produzindo colagénio e componentes da matriz extracelular. A ativação, diferenciação e recrutamento de miofibroblastos levam a um desequilíbrio entre mediadores antifibróticos e pró-fibróticos promovendo um processo excessivo e redundante de cicatrização (37).

Relativamente às associações genéticas já descritas, vários estudos identificaram o polimorfismo de nucleótido único (SNP) na região promotora do gene *MUC5B* (rs35705950) como o fator de risco significativamente associado a uma maior suscetibilidade de desenvolver FPI, no entanto, outras variantes genéticas podem contribuir para o desenvolvimento de FPI nomeadamente alterações nos genes *TERT*, *TERC* e *TOLLIP* (26). A identificação destes fatores de risco é de fundamental importância, pois auxiliam na prevenção, diagnóstico precoce e desenvolvimento de novas terapias (27, 32).

1.3. Pneumonite de hipersensibilidade

A pneumonite de hipersensibilidade, também denominada alveolite alérgica extrínseca, é uma doença pulmonar intersticial causada por uma resposta imune exagerada após a inalação de uma ampla variedade de partículas antigénicas encontradas no ambiente (38).

A sua prevalência está aumentada em indivíduos com idade superior a 65 anos, não sendo claro se existe uma incidência preferencial de acordo com género do paciente dado que alguns estudos relatam maior incidência em indivíduos do sexo feminino (39), enquanto outros demonstram uma maior incidência em indivíduos do sexo masculino (40, 41).

Um dado interessante e que distingue a PH de outras patologias respiratórias é a associação de uma maior prevalência de PH em indivíduos não fumadores (17). A causa por detrás desta aparente proteção permanece pouco esclarecida, no entanto, pensa-se que poderá estar relacionada com a capacidade da nicotina afetar negativamente a função dos linfócitos e macrófagos alterando o curso da doença (42, 43). No entanto, fumadores que desenvolvam a doença apresentam um fenótipo fibrótico progressivo mais severo (44).

Relativamente à sintomatologia, os sintomas relacionados com esta patologia são normalmente heterogéneos e não específicos, à semelhança do que acontece com a FPI, e incluem tosse, dispneia, perda de peso, dor no peito e fadiga (38, 45).

Atualmente, estima-se que a incidência de PH nos Estados Unidos varia entre 1,3 e 1,9 por 100.000 pessoas por ano e na Europa entre 0,3 e 0,9 por 100.000 habitantes (17, 46), manifestando-se como uma doença rara. No entanto, noutras regiões como a Índia, a PH é a DPI mais prevalente correspondendo a cerca de 48% dos casos (47).

A exposição aos antígenos inalatórios é considerada a principal causa de pneumonite de hipersensibilidade (17). Mais de 200 antígenos já foram identificados como agentes desencadeantes de PH e podem ser encontrados no ambiente de trabalho, em casa, ou em locais de atividades recreativas (48, 49). Os antígenos mais comuns incluem bolores, bactérias, proteínas animais (principalmente derivadas de aves) e até compostos químicos de baixo peso molecular, como isocianetos (17, 38). Portanto, indivíduos com exposição agrícola, pecuária, aviária, bem como trabalhadores que utilizam metais fluidos, que trabalham no processamento e construção de madeira, fabricação de têxteis e até mesmo indivíduos que manuseiam frequentemente tintas ou outros produtos químicos possuem um risco acrescido de desenvolver PH (49).

Num trabalho anterior do nosso centro, 634 pacientes foram diagnosticados com DPI, dos quais 123 (19.4%) eram casos de PH (38). Estes números estão acima da média mundial e podem relacionar-se com a elevada humidade que se faz sentir na nossa região, suportando o aumento do crescimento fúngico e, portanto, o aumento do risco de exposição prolongada a estes antígenos (49).

O trato respiratório, tanto superior como inferior, encontra-se constantemente exposto a agressões do ambiente externo, estando suscetível a inalação e agressão por parte de agentes ambientais, bem como agentes infecciosos, passíveis de desencadear uma resposta deletéria (16, 39). Deste modo, o sistema imunitário atua de forma a proteger o organismo, impedindo a entrada de patógenos no trato respiratório, primeiramente através de barreiras físicas e elevada produção de muco pelas células epiteliais do trato respiratório e, localmente, recorrendo a células imunes residentes no pulmão tais como os macrófagos alveolares (12, 16). Estas células, quando ativadas, têm a capacidade de reconhecer e apresentar antígenos aos linfócitos T, desencadeando toda a cascata de sinalização e ativação destas células que são fundamentais para a patogénese da PH (16).

As células inatas ativadas possuem também a função de secretar citocinas como interferão gama ($IFN\gamma$) e interleucina (IL) 12 que irão contribuir para a polarização e diferenciação das células T *naïve*, propagando o *feedback* positivo para a manutenção e ampliação da população de células T CD4 produtoras de $IFN\gamma$ – células Th1 (50). Com o avançar da doença e o possível desenvolvimento de fibrose, tem sido descrita uma alteração de fenótipo Th1 para fenótipo Th2, ainda pouco esclarecida. Citocinas características de uma resposta Th2, como IL4 e IL13, estão associadas com a proliferação continuada de fibroblastos e o aumento da produção de matriz extracelular e, por isso, com um fenótipo fibrosante progressivo observado em alguns pacientes com PH (51, 52). Sendo a imunopatogénese da PH uma combinação de reações de hipersensibilidade de tipo III e tipo IV (53), processos humorais também desempenham um papel importante na PH (Figura 4) (17).

Relativamente aos fatores genéticos com associação já descrita para a pneumonite de hipersensibilidade, à semelhança do que acontece na FPI, o polimorfismo de nucleótido único do promotor do gene *MUC5B* foi descrito, recentemente, como estando associado a maior prevalência e menor sobrevida em pacientes

com PH fibrótica (45, 54). Outras variantes genéticas também têm sido associadas a uma predisposição para desenvolver PH, tais como polimorfismos no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) principalmente de classe II, bem como mutações genéticas relacionadas com o comprimento dos telômeros e polimorfismos no proteossoma (45, 50).

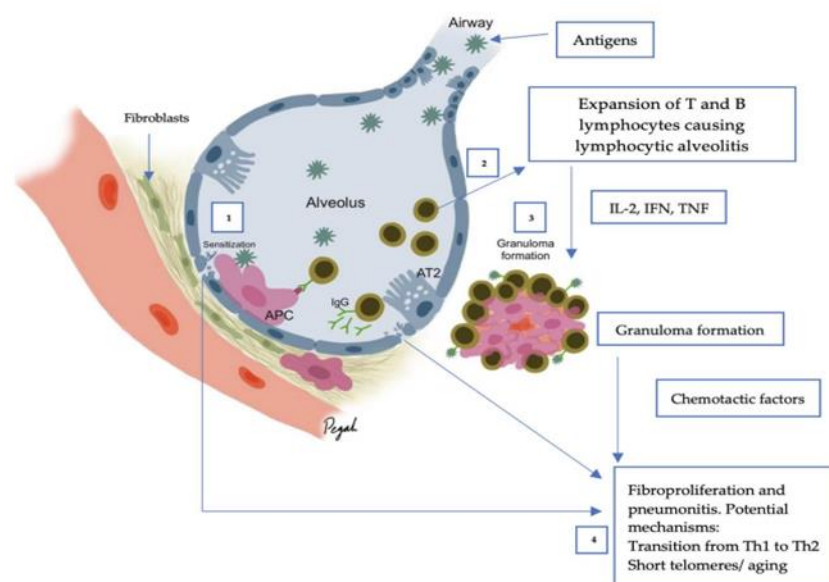


Figura 4. Imunopatogênese da pneumonite de hipersensibilidade. Os antígenos inalados interagem com as células apresentadoras de antígenos (APCs) (como macrófagos alveolares e células dendríticas) via receptores de reconhecimento padrão (PRR) (etapa 1). As APCs vão também secretar diferentes citocinas que criam um ambiente propício à ativação e diferenciação de células T num fenótipo Th1. Células B produzem anticorpos (resposta humoral (etapa 2)) que desencadeiam a cascata do complemento e estimulam macrófagos a fundirem-se originando células gigantes multinucleadas importantes para a formação de granulomas (etapa 3). Os granulomas produzem fatores quimiotáticos que, em combinação com a função desregulada das células T, promovem a proliferação fibroblástica (etapa 4). Os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos, produzem colagénio e matriz extracelular causando fibrose. Figura retirada de (22).

De acordo com as recentes diretrizes combinadas da *American Thoracic Society (ATS)/Japanese Respiratory Society (JRS)/Latin American Thoracic Association (LATA)*, a PH distingue-se em dois tipos, fibrótica e não fibrótica. A PH não fibrótica pode regredir completamente após a eliminação da exposição e, na maioria dos pacientes, é associada a melhor prognóstico, enquanto a PH fibrótica pode progredir continuamente, apesar da eliminação do antígeno, resultando em fibrose pulmonar progressiva em cerca de 20% dos pacientes (55). Sendo a PH fibrótica considerada clinicamente semelhante à fibrose pulmonar idiopática, acredita-se que possam compartilhar vias fibroproliferativas comuns e que muito do já conhecido para a FPI também seja válido para os casos de pneumonite de hipersensibilidade fibróticos (Figura 5) (54, 56).

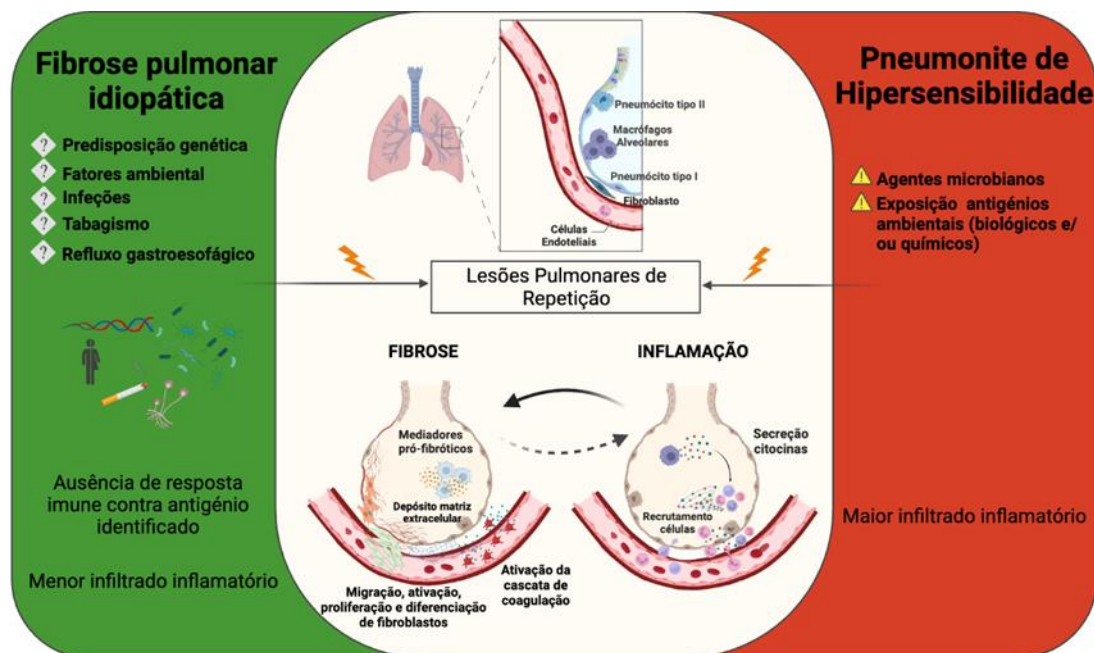


Figura 5. Comparação entre a fibrose pulmonar idiopática e a pneumonite de hipersensibilidade (imagem criada com auxílio da plataforma *online BioRender.com*). Diferentes etiologias principais podem estar associadas a um risco aumentado de desenvolver fibrose pulmonar idiopática (FPI) ou pneumonite de hipersensibilidade (PH). Após sucessivas lesões pulmonares num indivíduo geneticamente predisposto existe um dano do epitélio alveolar, seguido de um processo de reparação anormal com proliferação descontrolada e desorganizada de miofibroblastos que leva à distorção gradual da arquitetura pulmonar. Este processo, em conjunto com o aumento de fatores pró-fibróticos no meio, levam à produção e acumulação de matriz extracelular característica do processo fibrótico. No caso da FPI, este processo mantém-se de forma autossustentada, levando a uma progressão continuada e com grande impacto na função pulmonar. Por outro lado, a pneumonite de hipersensibilidade pode, em alguns casos, manifestar-se inicialmente como uma patologia inflamatória, caracterizada por grande infiltrado inflamatório e com possibilidade de reversão caso exista identificação e cessação da exposição desencadeadora. Noutros casos de PH, ou caso a exposição e agressão persistam, a doença evolui para um estadio fibrótico e eventualmente continuamente progressivo, aproximando-se das manifestações descritas para a FPI.

1.4. Predisposição genética – importância do gene *MUC5B* nas DPLs

Vários estudos ilustraram que os fatores genéticos contribuem para o risco e suscetibilidade aumentada de desenvolvimento de doenças pulmonares intersticiais, principalmente FPI, estando descritas associações com variantes genéticas raras e comuns. As variantes raras são aquelas cujo a frequência alélica menor é de <0,1%, estes incluem alterações em genes como *SFTPC*, *SFTPA1*, *SFTPA2*, *ATP-binding cassette-type 3 (ABCA3)* e *NAF1*, estão relacionados com a estabilidade alveolar, bem como os genes ligados à biologia dos telómeros *TERT*, *TERC*, *DKC1*, *TINF2*, *RTEL1* e *PARN*. Destas variantes mencionadas a variante *TERT* é a variante rara mais frequentemente associada à fibrose pulmonar, sendo encontrada em aproximadamente 15% dos casos FPI (35).

As variantes comuns são definidas como possuindo uma frequência do alelo menor superior a 5%, salienta-se o polimorfismo (rs35705950), localizado na região promotora do gene da mucina 5B (*MUC5B*) (Figura 6) (35, 62).

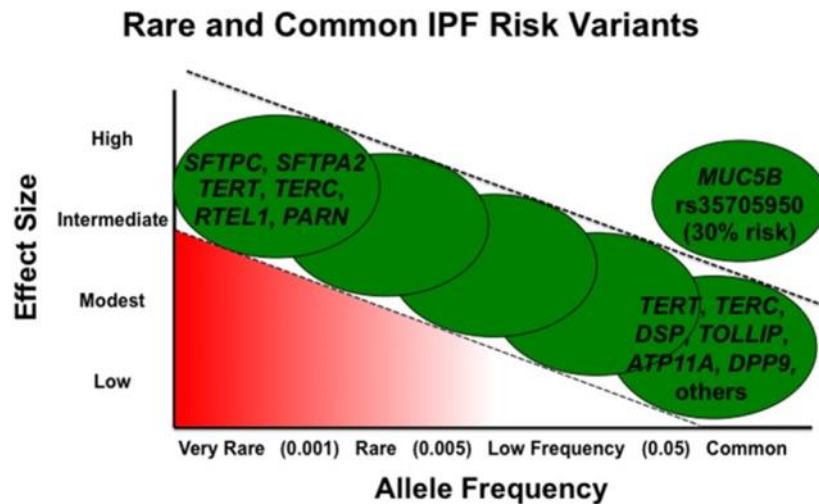


Figura 6. Espectro de variantes genéticas conhecidas associadas a um o risco aumentado de desenvolver FPI e as suas frequências alélicas relativas e efeito (30). Frequências alélicas são definidas pelo padrão: muito raro (0.001), raro (0.005), baixa frequência (0.05) e comum, bem como pelo seu efeito: baixo, moderado, intermédio e alto. No geral, apesar das variantes raras terem uma baixa frequência alélica o seu efeito é muito marcado, enquanto as variantes comuns estão muito associadas com a doença, mas apresentam um efeito baixo. As variantes raras associadas com FPI incluem os seguintes genes *SFTPC*, *SFTPA1*, *SFTPA2*, *ATP (ABCA3)* e *NAF1*, bem como os genes ligados à função dos telómeros *TERT*, *TERC*, *RTEL1* e *PARN*. No entanto, o polimorfismo rs35705950 no promotor do gene *MUC5B* apesar de corresponder a uma variante comum tem um *size effect* aumentado.

O gene *MUC5B* está localizado no cromossoma 11p15.5 e o SNP rs35705950 na variante promotora do gene *MUC5B* encontra-se aproximadamente a 3kb a montante do local de início da transcrição da proteína *MUC5B*, numa região altamente conservada com função reguladora (45, 46, 47). Codifica a glicoproteína de alto peso molecular mucina 5B, que aumenta a viscosidade do gel mucoso nas vias aéreas. *MUC5B* é expressa na mucosa das vias aéreas, e o seu produto está envolvido na manutenção da homeostase da imunidade inata e na depuração mucociliar, sendo crucial no controlo de infeções (55, 57).

Estudos genéticos têm identificado constantemente a variante promotora de ganho de função *MUC5B* rs35705950, que é uma transversão G/T, como o fator de risco dominante para o desenvolvimento de FPI, estando o alelo menor (T) associado à doença. Estima-se que esta variante seja responsável por 30% do risco de desenvolver FPI (30, 45). Portanto, o SNP rs35705950 pode ser um importante biomarcador para *screening* de fibrose pulmonar pré-clínica, possibilitando a identificação precoce dos indivíduos com risco aumentado para desenvolver FPI (42).

Ao contrário do que acontece na FPI, menos tem sido descrito para a PH, no entanto, mais recentemente também foi reportada a associação entre a presença do alelo menor do SNP rs35705950 do gene *MUC5B* e a incidência da PH, nomeadamente da PH com fenótipo fibrótico, consequentemente associando também a menor sobrevivência (45, 54).

1.5. Contextualização e objetivo

A pneumonite de hipersensibilidade é uma doença intersticial pulmonar, mediada imunologicamente, e que pode, em alguns casos, manifestar-se com um fenótipo maioritariamente inflamatório e eventualmente reversível, enquanto noutros pode apresentar sinais de fibrose, de extensão variada, podendo progredir progressivamente. A PH fibrótica possui uma sintomatologia, morbilidade e mortalidade próxima do observado na fibrose pulmonar idiopática, no entanto, os mecanismos que a desencadeiam, fatores de risco e adequada metodologia para diagnóstico precoce permanecem pouco esclarecidos.

O presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar o papel do polimorfismo de nucleótido único rs35705950 na região promotora do gene *MUC5B* nas vias moleculares comuns ligadas às DPLs-FP, nomeadamente, na pneumonite de hipersensibilidade fibrótica, usando como grupo comparador pacientes diagnosticados com fibrose pulmonar idiopática. Concretamente avaliamos:

- A frequência do alelo menor do SNP s35705950 *MUC5B* em pacientes com pneumonite de hipersensibilidade fibrosante;
- A expressão, localização e função da Mucina5B no tecido pulmonar destes doentes;
- Efeito do alelo menor do SNP s35705950 *MUC5B* na distribuição das populações celulares no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com pneumonite de hipersensibilidade fibrosante comparativamente com doentes com fibrose pulmonar idiopática.

Apesar de cada uma das DPLs apresentar características que as distinguem em termos clínicos, radiológicos e histopatológicos, também apresentam manifestações sobreponíveis, sendo o diagnóstico precoce e preciso desafiante mas crucial para garantir que cada paciente recebe tratamento adequado, idealmente, antes de uma progressão rápida e irreversível.

2. Metodologia

2.1. Participantes e desenho do estudo

Para o presente trabalho foram utilizados casos provenientes de diferentes coortes de doentes/controles saudáveis:

1) Estudo retrospectivo caso–controlo com 64 doentes com FPI, seguidos de 2013 a 2018, cujos dados já foram publicados num estudo prévio (26).

2) Grupo controlo com indivíduos saudáveis (distribuição etária e proporções de género semelhantes ao grupo de doentes) selecionado do EPIPorto (26), bem como alguns casos gentilmente cedidos pelo Cardibanco, biobanco da unidade de cardiologia do Centro Hospitalar Universitário São João;

3) Restantes casos de FPI e casos de PH são provenientes do estudo prospetivo FIBRALUNG com biobanco de amostras de pacientes com fibrose pulmonar, iniciado em 2021 e ainda em fase de recrutamento (estudo depositado no *ClinicalTrials.gov* com a seguinte identificação NCT05635032).

Todos os pacientes foram discutidos em reunião de grupo multidisciplinar e o seu diagnóstico foi estabelecido após avaliação de parâmetros clínicos, funcionais, radiológicos, bem como integração da informação relativa a exposições ambientais e, sempre que disponível, informação sobre as populações celulares presentes no lavado broncoalveolar e análise histológica.

A coorte prospetiva tem como critérios de inclusão:

- idade entre os 18-80 anos;
- pacientes que realizem biópsia pulmonar ou LBA no serviço de pneumologia do Centro Hospitalar Universitário São João como parte do seu processo de diagnóstico;
- capacidade de realizar protocolos de seguimento;
- tomografia computacional de alta resolução, realizada nos últimos 12 meses da data de admissão, demonstrando áreas de fibrose pulmonar com extensão $\geq 10\%$.

Pacientes sem capacidade de assinar consentimento informado ou grávidas são excluídos do estudo. O total de casos usado no presente trabalho para a análise genética segue a distribuição indicada na Figura 7.

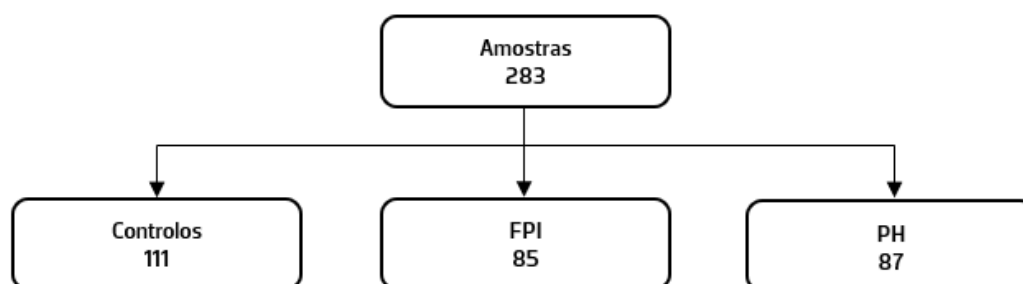


Figura 7. Caracterização da amostragem em estudo. Para a execução deste trabalho, foram utilizadas um total de 283 amostras, dos quais 111 eram casos controlos, 85 doentes com diagnóstico de fibrose pulmonar idiopática (FPI), usado como protótipo de doença fibrosante progressiva e 87 com diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade (PH).

2.2. Implicações Éticas e legais

O presente estudo foi revisto e aprovado de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar Universitário de São João e realizado de acordo com a declaração de Helsínquia. Todos os participantes foram devidamente informados acerca do estudo e assinaram um consentimento livre e informado.

2.3. Colheita de amostras biológicas e contagem celular no LBA

Sangue periférico foi colhido para tubos tratados com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (*BD Vacutainer®*). As amostras foram devidamente codificadas de forma anonimizar os pacientes, aliquotadas e armazenadas a -70°C até à extração de DNA.

O lavado broncoalveolar consiste na instilação de 200 ml de soro salino estéril, isotónico, pré aquecido a 37°C, dividido em quatro alíquotas de 50 ml. O volume instilado é posteriormente recolhido por aspiração e a primeira alíquota recolhida será usada para análises microbiológicas. As restantes três alíquotas serão homogeneizadas e analisadas para contagens celulares totais. Um total de 500 células foram contadas em *citospins* corados com *Wright-Giemsa*, de acordo com metodologia já descrita e validada (48).

O tecido pulmonar de pacientes com FPI e PH foi obtido através de criobiópsias. Os fragmentos foram fixados em formol neutro tamponado a 10% e processados para rotina histológica.

Tecido pulmonar sem doença pulmonar intersticial corresponde a fragmentos de parênquima pulmonar sem lesão obtidos a partir de peças de ressecção cirúrgica por neoplasia.

2.4. Extração de DNA e genotipagem da variante na região promotora do gene *MUC5B* (SNP rs35705950)

O DNA genómico foi extraído a partir de amostras de sangue periférico com recurso ao *kit* de purificação *QIAamp DNA Blood* da *Qiagen*, de acordo com as instruções do fornecedor. Após extração as amostras foram quantificadas por *Nanodrop One™*.

A genotipagem do polimorfismo de nucleótido único rs35705950 foi realizada com recurso a sondas disponíveis comercialmente, *TaqMan SNP Genotyping Assay*, *ThermoFisher* (referência C_1582254_20). Resumidamente, duas sondas alelo-específicas marcadas com fluorocromos diferentes (FAM e VIC), bem como um par de *primers* específicos para a região de interesse, foram usados ([VIC/FAM]: CCTTCCTTTATCTTCTGTTTTTCAGC[G/T]CCTTCAACTGTGAAGAGGTGAAGTCTC). Durante a reação, a DNA polimerase foi usada para clivar o marcador fluorescente (FAM ou VIC) da sonda hibridada na cadeia de DNA, levando à emissão de fluorescência. A reação foi realizada no equipamento CFX96 da *BioRad* de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e emparelhamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Os resultados foram analisados no *software CFX Manager* (*BioRad*).

2.5. Imunohistoquímica

Os blocos de parafina foram seccionados no micrótomo a uma espessura de 3–4 μm . Após correta adesão à lâmina, procedeu-se à desparafinação e hidratação dos cortes.

A técnica de imunohistoquímica é iniciada com uma recuperação antigénica a 95°C durante 30 minutos usando uma solução comercial (*HIER buffer, ThermoScientific*). Interações inespecíficas foram bloqueadas durante 1 hora com uma solução de albumina sérica de bovino (BSA) a 5%. Após otimização do anticorpo primário (*Anti-MUC5B da Sigma®–Aldrich policlonal*, produzido em coelho) estabeleceu-se que a melhor diluição seria 1:100 em 1% BSA em PBS – 0,05% *Tween20* (PBS-T), numa incubação *overnight* a 4°C.

Após lavagens com PBS-T, procedeu-se ao bloqueio de peroxidases endógenas com 0,3% H_2O_2 . O anticorpo secundário anti-IgG de coelho-HRP foi incubado à temperatura ambiente durante 1 hora. A solução 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) foi utilizada como cromogénio e o seu excesso foi removido com água corrente. Para uma melhor contrastação nuclear, realizou um passo de coloração com Hematoxilina de Gill. Após desidratação em concentrações crescentes de etanol e diafanização em xilol, as lâminas foram montadas com *entellan™* e enviadas para digitalização (*NanoZoomer 2.0HT, Hamamatsu*). Após digitalização as imagens foram visualizadas no *software NDP View2*.

O controlo negativo da técnica foi obtido por omissão de incubação com anticorpo primário.

2.6. Quantificação da área positiva para MUC5B

Imagens obtidas após digitalização foram analisadas com recurso ao *software ImageJ* Versão 2.1 para determinação da percentagem de área de tecido com marcação positiva para MUC5B. Foram retiradas diferentes secções de cada fragmento e com o auxílio da ferramenta "*image deconvolution*" do *ImageJ* foi ajustado um *threshold* para o canal correspondente à marcação com DAB. Este *threshold* foi estabelecido com base num controlo negativo técnico (sem incubação com anticorpo primário) e foi aplicado a todas as imagens. A área de marcação positiva para a MUC5B é apresentada como uma média de áreas das diferentes imagens de um mesmo fragmento.

2.7. Análise estatística

Todos os dados foram analisados com o *software GraphPad Prism™ v8* (*GraphPad Software®*). Os resultados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Testes estatísticos específicos estão indicados na legenda de cada figura. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando o $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Pneumonite de hipersensibilidade é a patologia com maior incidência na coorte de pacientes do FIBRALUNG

O estudo prospetivo FIBRALUNG vai de encontro ao já descrito no nosso centro, numa coorte retrospectiva, onde a pneumonite de hipersensibilidade foi descrita como a patologia com maior incidência (43). A coorte do FIBRALUNG conta, à data do presente trabalho, com mais de 400 doentes, e inclui pacientes da região norte e centro de Portugal que, após assinarem consentimento informado, integraram no estudo aquando da realização de lavado broncoalveolar e/ou criobiópsia no Centro Hospitalar Universitário São João.

Como observado entre os casos com diagnóstico já finalizado, a DPI mais prevalente é a pneumonite de hipersensibilidade (Fig. 8A), tanto fibrótica como não fibrótica, representando cerca de 40% dos casos de doenças pulmonares intersticiais. Dados de outros países indicam a fibrose pulmonar idiopática e a sarcoidose como as DPIs mais frequentes (64), aqui apenas correspondendo a 12.86 e 11.9% dos casos, respetivamente.

A prevalência da PH varia geograficamente em função de diferentes condicionantes como predisposição genética e exposições ambientais. De acordo com dados recolhidos no nosso centro, e um projeto paralelo que se encontra em desenvolvimento com esta mesma coorte de doentes, acreditamos que esta incidência aumentada está fortemente relacionada com um tipo de exposição antigénica oculta e muitas vezes pouco valorizada: a exposição prolongada a fungos nas habitações. Esta observação está relacionada com a elevada humidade que se faz sentir na nossa região associada a uma construção e ventilação inadequadas de muitas das habitações, suportando o crescimento fúngico e, portanto, o aumentando o risco de exposição prolongada a estes antígenos (54).

Os restantes pacientes da coorte FIBRALUNG possuem diagnósticos com menor prevalência como doenças associadas ao tabaco, doenças autoimunes com envolvimento pulmonar, DPI inclassificáveis, doença intersticial não específica, doenças com componente familiar e doenças ocupacionais, como por exemplo a silicose (Fig. 8A).

Tirando partido da elevada incidência de PH na nossa coorte decidimos aprofundar o estudo desta patologia, nomeadamente da pneumonite de hipersensibilidade fibrótica que corresponde a cerca de 80% dos casos de PH (Fig. 8B) e que, em muitos casos, poderá estar associada a um fenótipo fibrótico progressivo.

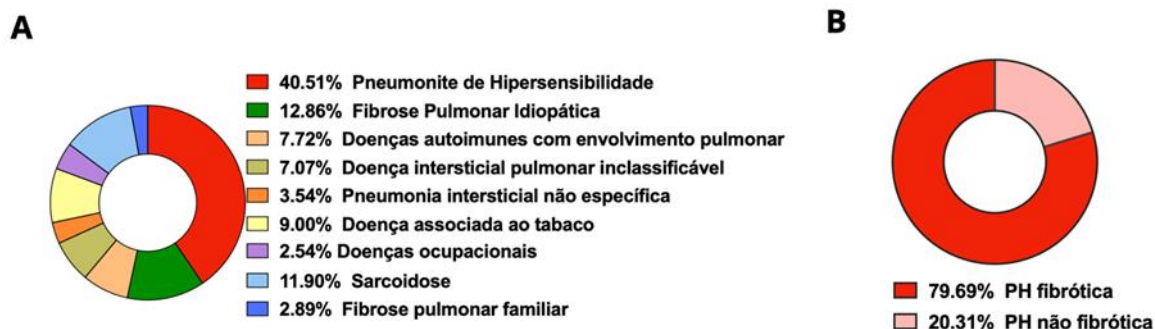


Figura 8. Distribuição, de acordo com o diagnóstico, dos pacientes incluídos na coorte FIBRALUNG. A) Dos 431 doentes incluídos nesta coorte à data do presente trabalho foram retirados 120: 65 que demonstraram não apresentar doença pulmonar intersticial e 55 que se encontram ainda em processo de diagnóstico. Os restantes 311 casos estão representados no gráfico, distribuídos de acordo com o diagnóstico atribuído. B) Distinção entre pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica e não fibrótica. Num total de 126 casos diagnosticados com PH 79.69% correspondem ao fenótipo fibrótico, associado a pior prognóstico.

3.2. A frequência das diferentes populações de células imunes em lavados broncoalveolares de pacientes com PH fibrótica e FPI é comparável

Com o objetivo de melhor compreender quais as populações celulares imunes (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos) mais prevalentes nos lavados broncoalveolares das patologias em estudo incluímos casos de coortes retrospectivas, do nosso centro, de forma a aumentar o número de casos por grupo e adicionar robustez à análise. Noventa e quatro pacientes com PH fibrótica (a vermelho) e setenta e oito pacientes com FPI (a verde) foram incluídos nesta análise (Figura 9), salientando que cada ponto no gráfico corresponde a um doente. Na impossibilidade de termos controlos saudáveis para esta análise, uma vez que é um procedimento invasivo e com riscos associados, comparamos apenas as duas patologias.

Em ambos os grupos verificamos que o tipo celular mais abundante são os macrófagos, não sendo possível, com esta abordagem, caracterizar estes macrófagos quanto à sua origem – macrófagos alveolares e/ou macrófagos derivados de monócitos em circulação.

De uma forma geral, os casos com FPI e com PH fibrótica assemelham-se, tendo as populações celulares presentes nos LBAs de cada grupo frequências aproximadas. De salientar a elevada variabilidade observada principalmente nos pacientes com diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade fibrótica, variabilidade essa que pode estar associada com as diferentes fases e severidades da doença.

Diferentes estudos têm associado o diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade com linfocitose no LBA, sendo esse dado um dos critérios descrito nas *guidelines* para um diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade de maior grau de confiança (45). Contudo, dos 94 pacientes com PH fibrótica analisados na Figura 9, apenas 26% possuem uma percentagem de linfócitos acima do valor de referência (45).

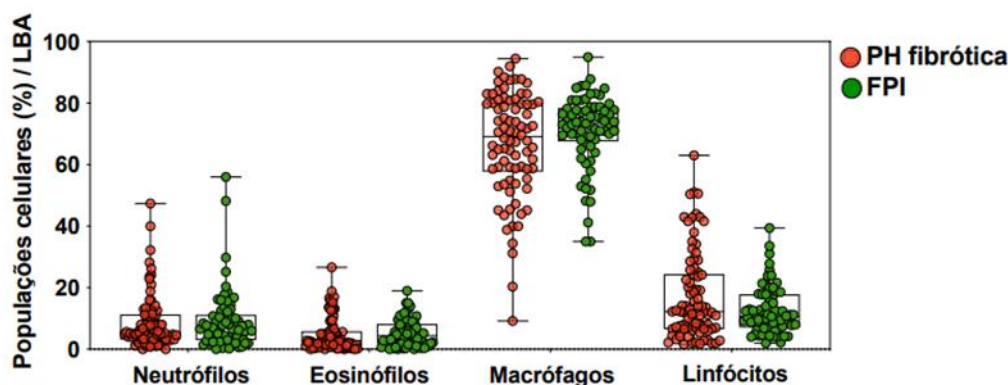


Figura 9. Populações celulares presentes no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica e fibrose pulmonar idiopática (FPI) apresentam uma distribuição semelhante. Fluido recolhido por aspiração após instilação de soro salino estéril, isotônico e pré aquecido, nas vias respiratórias é, posteriormente, usado para realizar contagens celulares de populações imunes através de *cytospin*. A vermelho encontra-se representado os pacientes com o diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade fibrótica e a verde pacientes com fibrose pulmonar idiopática. Cada ponto corresponde a um único paciente.

Estes dados reforçam a necessidade de se encontrarem novos e melhores parâmetros não só de diagnóstico, mas também que auxiliem na estratificação de acordo com o prognóstico destes doentes.

3.3. Frequência do alelo menor do SNP rs35705950 encontra-se aumentada em doentes com pneumonite de hipersensibilidade fibrótica

A predisposição genética para o desenvolvimento de fibrose pulmonar tem sido objeto de extensa pesquisa científica (60). A presença do alelo T no SNP rs35705950 da região promotora do gene *MUC5B* tem sido o fator genético mais associado à suscetibilidade de desenvolver FPI (65). Estudos mais recentes têm sugerido que os fatores de risco genéticos associados ao desenvolvimento e progressão da FPI, nomeadamente o SNP rs35705950, também podem estar associados à incidência aumentada de PH fibrótica e redução da sobrevida nestes pacientes (59). Desta forma, analisamos o genótipo associado ao polimorfismo de nucleótido único rs35705950 na nossa coorte de doentes.

Um total de 111 controlos, 85 pacientes com FPI e 87 com PH fibrótica foram utilizados nesta análise. A genotipagem do SNP rs35705950 permitiu caracterizar a prevalência dos genótipos GG, GT e TT na nossa coorte, representados numa escala de azul, do mais claro (GG) ao mais escuro (TT) (Figura 10). Os resultados obtidos mostram que o grupo controlo (primeira coluna à esquerda) é maioritariamente constituído por indivíduos homozigóticos para o alelo G (GG: 78.38%, GT: 20.72% e TT: 0.90 %), ao contrário do que acontece nos grupos de pacientes com FPI (coluna do meio) e com PH fibrótica (coluna da direita), onde a frequência de indivíduos portadores do alelo T aumenta drasticamente (FPI GG: 27.06%, GT: 57.65% e TT: 14.11%; PH fibrótica GG: 25.29%, GT: 63.22% e TT: 10.34%) (Figura 10). Com estes resultados, validamos, na nossa coorte, o já descrito previamente para a FPI (63) e mais recentemente para a PH (50).

De uma forma global, a frequência de genótipos onde o alelo menor T está presente corresponde a cerca de 75% dos casos tanto de FPI como de PH fibrótica, sendo a diferença entre estes dois grupos negligenciável.

De acordo com estudos anteriores, a presença do alelo menor para o SNP rs35705950 está associado com uma produção aumentada de MUC5B pelas células epiteliais bronquiolares distais, prejudicando a depuração mucociliar, o que contribui para o aumento da lesão pulmonar e consequente fibrose pulmonar (59). Estima-se que a presença do alelo T menor neste polimorfismo aumente o risco de fibrose pulmonar em 30–35% (60).

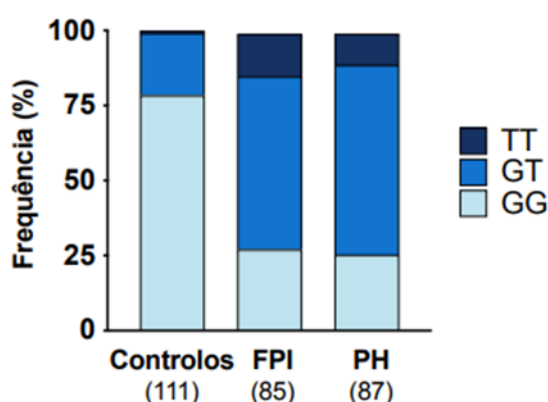


Figura 10. SNP rs35705950 da região promotora do gene *MUC5B* está associado com a incidência de fibrose pulmonar idiopática e de pneumonite de hipersensibilidade fibrótica. O DNA genómico foi extraído a partir de amostras de sangue periférico de 111 controlos saudáveis, 85 doentes com diagnóstico de fibrose pulmonar idiopática (FPI) e 87 doentes com diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica. A genotipagem do polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs35705950 foi realizada com recurso a sondas específicas. Cada coluna corresponde a um grupo de doentes estando os diferentes genótipos representados numa escala de azul. Alelo *wild type*: G; alelo menor: T.

Relativamente a uma possível associação deste SNP com a incidência de PH fibrótica, um estudo realizado com coortes de doentes da Universidade da Califórnia em São Francisco e da Universidade do Sudoeste do Texas demonstrou que as frequências dos genótipos são as seguintes: GG 58.6%, GT 37.9% e TT 3.4%, e GG 47.2%, GT 44.4% e TT 8.3%, respetivamente (59). Comparativamente ao observado neste estudo, a frequência dos genótipos GT/TT está aumentada na nossa população. Esta discrepância pode dever-se à população em si, dado que correspondem a doentes com origens geográficas diferentes, mas também à classificação e decisão de inclusão dos doentes. No estudo norte americano, de 2017, utilizam uma classificação de pneumonite de hipersensibilidade – PH crónica – já desatualizada, que dependia da duração dos sintomas (49). No nosso estudo utilizamos a classificação atualmente considerada relevante clinicamente e que se caracteriza pela presença de fibrose em exame radiológico e/ou histopatológico.

3.4. MUC5B apresenta expressão aumentada em doentes com FPI e PH fibrótica

Apesar da associação entre o SNP rs35705950 do gene *MUC5B* e a incidência de FPI ter já sido extensamente estudada, pouco se conhece ainda sobre o impacto da frequência aumentada do alelo T nas doenças pulmonares intersticiais, principalmente em DPI não FPI.

Com o objetivo de esclarecer a função da mucina 5B em doentes com pneumonite de hipersensibilidade fibrótica começamos por averiguar se, à semelhança do descrito para a FPI (66), também verificávamos um aumento de expressão no tecido pulmonar destes doentes. Para isso realizamos marcação imunohistoquímica, com recurso a anticorpo específico, em pacientes com FPI, PH fibrótica e controlos sem doença pulmonar intersticial. Estas amostras de pulmão sem DPI foram obtidas de peças cirúrgicas de ressecção de lobos/segmentos pulmonares por lesão maligna, onde se recolheu um fragmento de parênquima saudável o mais distante possível da área de lesão.

A análise imunohistoquímica revelou que os controlos saudáveis (Fig. 11A) apresentam uma expressão da MUC5B baixa, estando praticamente restrita ao epitélio secretor (Fig. 11A – 1 e 2). Em alguns campos é também possível observar uma marcação ligeira no citoplasma dos macrófagos alveolares (Fig. 11A – 3 e 4).

De acordo com o descrito na literatura, verificou-se um aumento da expressão da MUC5B nos doentes com FPI (67), aqui evidenciado no epitélio pulmonar, nos macrófagos alveolares e nas regiões de padrão histopatológico característico, regiões císticas com padrão em favo de mel, onde se observam regiões com acúmulo denso da mucina 5B (Fig. 11B – 1 e 2). Nos pacientes com PH fibrótica (Fig. 11C) também se verificou um aumento da expressão da MUC5B nas mesmas regiões acima mencionadas (Fig. 11C – 1 e 2). Gráfico com quantificação da área positiva para MUC5B é apresentado na Figura 11D. À semelhança do observado nas imagens, a análise quantitativa da percentagem de área positiva para MUC5B demonstrou um aumento estatisticamente significativo tanto nos casos de FPI (círculos a verde) como nos casos de PH fibrótica (círculos a vermelho) face ao grupo controlo (círculos a roxo). No entanto, sem diferença entre as duas patologias.

Como já mencionado, a desregulação da expressão da MUC5B e a disfunção das células ciliadas podem promover a acumulação de muco nas vias aéreas, comprometendo a resposta imune e perpetuando o dano tecidual, levando a exacerbações e progressão continuada da doença (67).

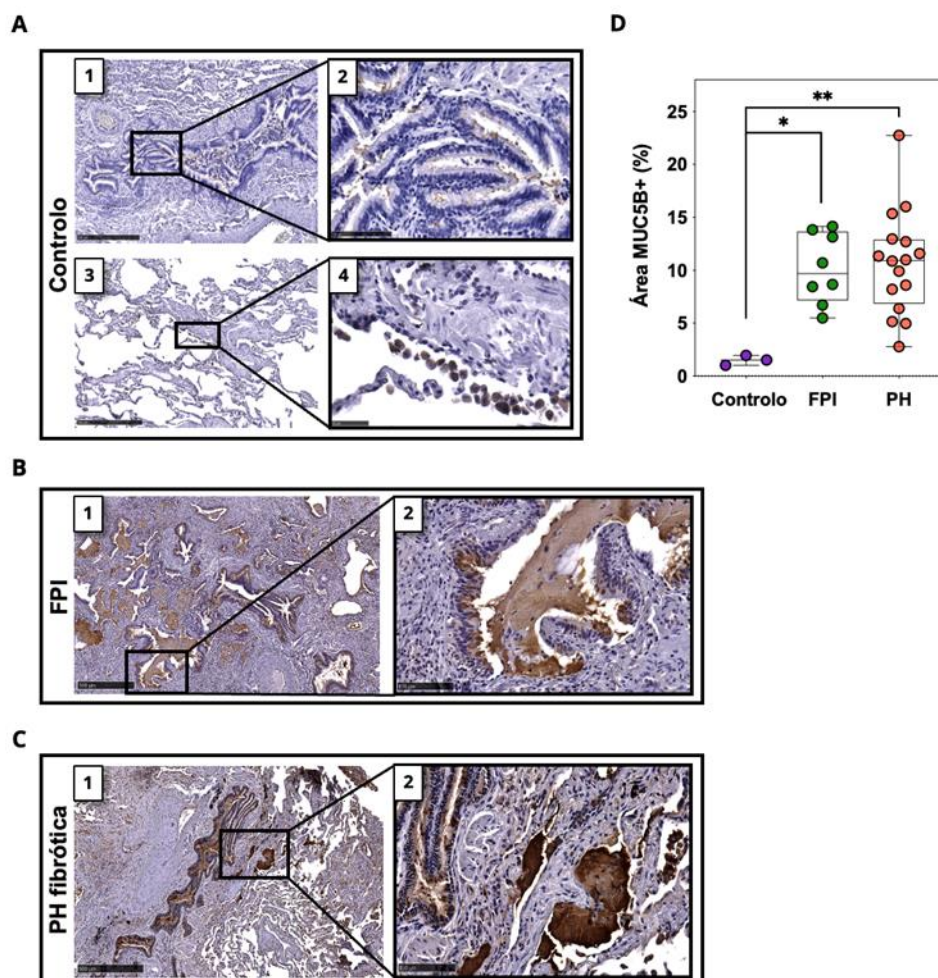


Figura 11. Expressão da proteína MUC5B encontra-se muito aumentada no tecido pulmonar de doentes com fibrose pulmonar idiopática (FPI) e pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica. Tecido pulmonar proveniente de biópsias ou de peças de ressecção cirúrgica foi processado para realização de imunohistoquímica anti-MUC5B usando a solução 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) como cromogénio e Hematoxilina de Gill como corante nuclear. Expressão de MUC5B em controles sem doença de interstício pulmonar (A), doentes com diagnóstico de fibrose pulmonar idiopática (B) e doentes com pneumonite de hipersensibilidade fibrótica (C). Escalas figuras 1 e 3: 500 μ m; Escalas figuras 2: 100 μ m; Escala da figura 4: 50 μ m. D) Análise quantitativa da percentagem de área tecidual positiva para marcação com MUC5B. Gráficos apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Cada ponto corresponde a um controle/doente. One-way ANOVA com teste de Tukey's para comparações múltiplas *, $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$.

3.5. Estratificação dos doentes com PH fibrótica de acordo com o seu genótipo para o SNP rs35705950 revela uma possível função dos macrófagos no desenvolvimento/manutenção da doença

Todos os resultados obtidos até ao momento, sugerem-nos que a PH fibrótica apresenta um perfil genético e de expressão da MUC5B muito semelhante ao descrito, e aqui validado na nossa coorte, para a FPI. Num estudo anterior, foi descrita uma associação entre o alelo T do SNP rs35705950 e um aumento da expressão de MUC5B no ambiente pulmonar (65). No entanto, este estudo carece de mais detalhes uma vez que não são exploradas as estruturas histopatológicas onde este aumento de expressão é mais visível. Dessa forma decidimos analisar os nossos casos de acordo com o genótipo (Fig. 12). De referir que

os controlos usados são todos homozigóticos para o alelo *wild-type* (G), o genótipo mais prevalente em indivíduos sem DPI (Fig. 10) e, portanto, não foram estratificados. No futuro, será interessante ter acesso a indivíduos sem DPI, mas portadores do alelo T para perceber o impacto que esse genótipo poderá ter na expressão da MUC5B em indivíduos sem doença intersticial pulmonar.

Como esperado, após estratificação de acordo com o genótipo continuamos a observar uma forte marcação para MUC5B em indivíduos com FPI (Fig. 12A) tanto no epitélio (Fig. 12A 1-3), como no citoplasma dos macrófagos alveolares (Fig. 12A 4-6) e nas regiões com padrão favo de mel (Fig. 12A 7-9). No entanto, contrariamente ao descrito na literatura, quando quantificamos a área positiva para MUC5B não vemos diferença entre os portadores do alelo T e os indivíduos homozigóticos para o alelo G (Fig. 12A, gráfico da direita).

Surpreendentemente, ao analisarmos os casos de PH fibrótica verificamos uma associação entre o alelo T e a expressão aumentada de MUC5B no pulmão destes doentes, sendo esses os casos responsáveis por uma diferença estatisticamente significativa face ao grupo controlo (Fig. 12B, gráfico da direita). É interessante constatar ao analisar as imagens que esse aumento é bastante visível nos macrófagos presentes no espaço alveolar (Fig. 12B 4-6). Pela primeira vez mostramos uma relação direta entre a presença do alelo T e uma maior expressão de MUC5B no pulmão de pacientes com PH fibrótica.

Uma hipótese para não observarmos essas diferenças entre genótipos na FPI pode dever-se às grandes áreas com padrão em favo de mel, padrão histológico associado a maior severidade e pior prognóstico, independente do genótipo, característico desta patologia, podendo camuflar pequenas variações entre indivíduos com genótipos diferentes. Para esclarecer este ponto, com uma amostragem maior, poderemos fazer uma análise da quantificação de área marcada por região histológica: epitélio secretor, macrófagos e padrão em favo de mel.

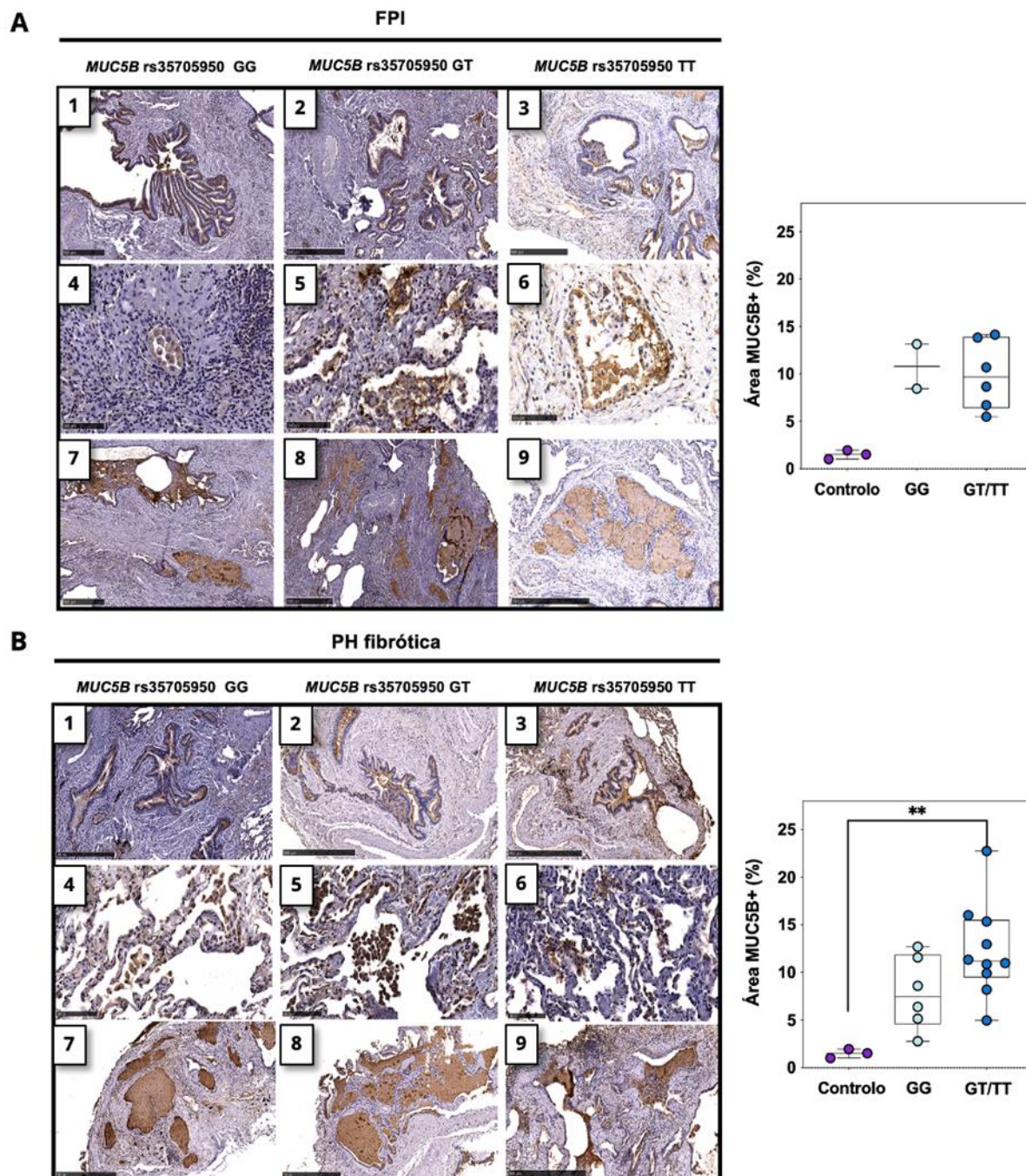


Figura 12. Expressão de MUC5B aumentada em pacientes com pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica portadores do alelo T. Tecido pulmonar proveniente de biopsias pulmonares foi processado para realização de imunohistoquímica anti-MUC5B usando a solução 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) como cromogénio e Hematoxilina de Gill como corante nuclear. Estratificação dos pacientes com fibrose pulmonar idiopática (FPI) (A) e com PH fibrótica (B) de acordo com o genótipo para o SNP rs35705950 do gene *MUC5B* e respetivo gráfico (à direita) de quantificação da área de tecido positiva para marcação com MUC5B. Imagens 1-3 evidencia o epitélio secretor. Escala: 500 μ m. Imagens 4-6 macrófagos alveolares. Escala: 100 μ m. Imagens 7-9 regiões de acúmulo denso de MUC5B em áreas de cistos em favo de mel. Escala: 500 μ m. Gráficos apresentados como média $\pm$ desvio padrão onde cada ponto corresponde a um controle/doente. One-way ANOVA com teste de Tukey's para comparações múltiplas. **, $p < 0.01$.

De salientar que dado que a obtenção de amostras de tecidos pulmonar é um procedimento altamente invasivo, apenas os casos em que não é possível chegar a um diagnóstico de confiança por outros

métodos complementares de diagnóstico seguem para biópsia pulmonar. Por esse motivo, o número reduzido de amostras limita o nosso estudo. No entanto, procuramos aumentar esta amostragem num futuro próximo.

Curiosamente, apesar de ser possível observar um aumento acentuado da expressão de MUC5B no interior dos macrófagos, essas células não são produtoras desta proteína. Levantando aqui a hipótese de que os macrófagos tecidulares poderão estar a incorporá-la durante o processo de *clearance*. Para melhor compreender a função destas células neste processo, voltamos a analisar os dados de distribuição celular nos lavados broncoalveolares e estratificamos os pacientes com FPI (Fig. 13A) e PH fibrótica (Fig. 13B) de acordo com o seu genótipo (GG, GT e TT), representados numa escala de azul, do mais claro (GG) ao mais escuro (TT). Em concordância com um possível papel relevante dos macrófagos na fisiopatologia destas doenças, estes são a única população celular alterada em ambas as patologias, na presença do alelo T. Este aumento da frequência dos macrófagos pode associar-se à sua função importante na promoção de um ambiente pro-fibrótico, contribuindo para a manutenção do processo fibrótico e consequente progressão da doença. A associação do aumento da frequência dos macrófagos no lavado broncoalveolar dos pacientes com PH fibrótica portadores do alelo T, juntamente com o aumento da expressão da mucina5B no ambiente pulmonar, nomeadamente no citoplasma dos macrófagos carece mais explicação, nomeadamente para se tentar compreender se estes dados poderão correlacionar com a progressão e prognóstico da doença, ajudando assim a estratificar precocemente os doentes, dirigindo a terapia – anti-inflamatória *versus* anti-fibrótica – para o que for mais vantajoso para cada paciente.

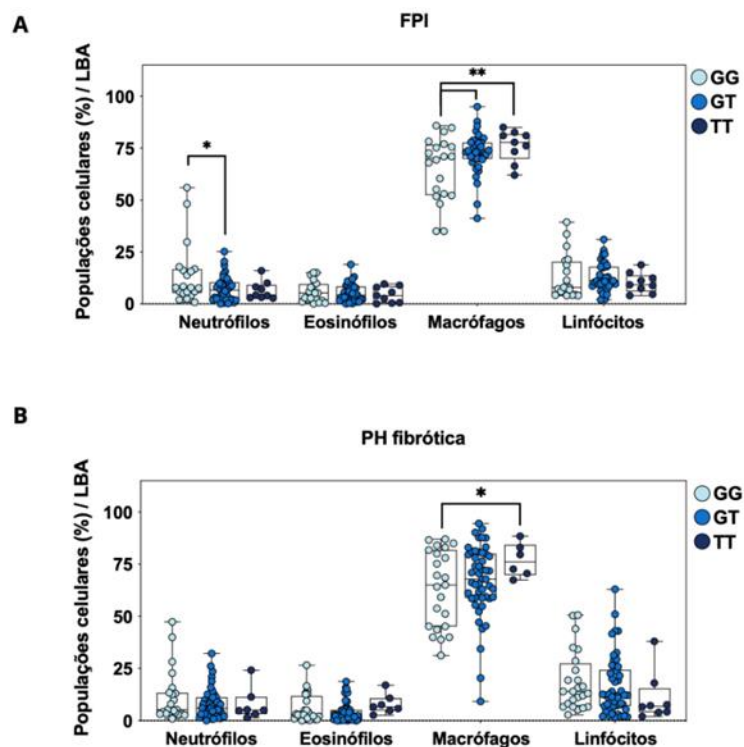


Figura 13. Indivíduos portadores de alelo T possuem um aumento da frequência de macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA). Fluido recolhido por aspiração após instilação de soro salino estéril, isotônico e pré aquecido, nas vias respiratórias é, posteriormente, usado para realizar contagens celulares de populações imunes através de *cytospin*. Distribuição celular em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (FPI) (A) e pneumonite de hipersensibilidade (PH) fibrótica (B). Cada ponto corresponde a um doente estando os diferentes genótipos representados numa escala de azul, do mais claro (GG) ao mais escuro (TT). *Two-way ANOVA* com teste de *Tukey's* para comparações múltiplas. *, $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$.

4. Conclusão e perspectivas futuras

Os nossos dados mostram que a variante comum do gene *MUC5B* também representa uma variante de risco para os doentes da nossa coorte, não só com FPI, mas também com PH fibrótica, à semelhança do descrito anteriormente para outras populações (59, 65).

A associação do alelo T com o aumento da expressão da *MUC5B* no tecido pulmonar e aumento da frequência dos macrófagos no lavado broncoalveolar destes doentes pode indicar uma associação do alelo T com o prognóstico/severidade da doença, tal como já descrito noutras populações (60). O papel dos macrófagos surge aqui com particular relevância e estamos neste momento a explorar uma eventual atividade aumentada destas células, por exemplo, no processo de *clearance* do ambiente pulmonar, através de diferentes metodologias como microscopia eletrónica.

A associação da *MUC5B* à etiologia da pneumonite de hipersensibilidade fibrótica pode abrir caminho para novos estudos na compreensão dos mecanismos básicos envolvidos na patogénese desta patologia e eventualmente de outras que apresentem um fenótipo fibrosante progressivo.

A extensa coorte de doentes a que temos acesso permite-nos aprofundar a caracterização desta patologia e, no futuro, estender às restantes patologias com fenótipo fibrosante progressivo de forma a decodificar vias fibroproliferativas comuns e potenciais biomarcadores e/ou *scores* de risco que nos ajudem a, precocemente, distinguir um paciente com eventual capacidade de progressão e ajustar o seguimento e tratamento em função dessa estratificação.

5. Referências Bibliográficas

1. Cottin V. Treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases: a milestone in the management of interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev.* 2019;28(153).
2. Cottin V, Wollin L, Fischer A, Quaresma M, Stowasser S, Harari S. Fibrosing interstitial lung diseases: knowns and unknowns. *Eur Respir Rev.* 2019;28(151).
3. Flaherty KR, Brown KK, Wells AU, Clerisme-Beaty E, Collard HR, Cottin V, et al. Design of the PF-ILD trial: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial of nintedanib in patients with progressive fibrosing interstitial lung disease. *BMJ Open Respir Res.* 2017;4(1):e000212.
4. Cottin V, Hirani NA, Hotchkin DL, Nambiar AM, Ogura T, Otaola M, et al. Presentation, diagnosis and clinical course of the spectrum of progressive-fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev.* 2018;27(150).
5. Olson AL, Gifford AH, Inase N, Fernandez Perez ER, Suda T. The epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial lung diseases at risk of a progressive-fibrosing phenotype. *Eur Respir Rev.* 2018;27(150).
6. Behr J. Approach to the diagnosis of interstitial lung disease. *Clin Chest Med.* 2012;33(1):1-10.
7. Alhamad EH, Cosgrove GP. Interstitial lung disease: the initial approach. *Med Clin North Am.* 2011;95(6):1071-93.
8. Travis WD, King TE, Bateman ED, Lynch DA, Capron F, Center D, et al. American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2002;165(2):277-304.
9. Mira-Avendano I, Abril A, Burger CD, Dellaripa PF, Fischer A, Gotway MB, et al. Interstitial Lung Disease and Other Pulmonary Manifestations in Connective Tissue Diseases. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(2):309-25.
10. Cottin V, Valenzuela C. Diagnostic approach of fibrosing interstitial lung diseases of unknown origin. *Presse Med.* 2020;49(2):104021.
11. Walsh SLF, Devaraj A, Enghelmayer JI, Kishi K, Silva RS, Patel N, et al. Role of imaging in progressive-fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev.* 2018;27(150).
12. Sweis JIG, Sweis NWG, Alnaimat F, Jansz J, Liao TE, Alsakaty A, et al. Immune-mediated lung diseases: A narrative review. *Front Med (Lausanne).* 2023;10:1160755.
13. Sese L, Khamis W, Jeny F, Uzunhan Y, Duchemann B, Valeyre D, et al. Adult interstitial lung diseases and their epidemiology. *Presse Med.* 2020;49(2):104023.
14. Wijsenbeek M, Cottin V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *N Engl J Med.* 2020;383(10):958-68.
15. Wijsenbeek M, Kreuter M, Olson A, Fischer A, Bendstrup E, Wells CD, et al. Progressive fibrosing interstitial lung diseases: current practice in diagnosis and management. *Curr Med Res Opin.* 2019;35(11):2015-24.

16. Kawasaki T, Ikegawa M, Kawai T. Antigen Presentation in the Lung. *Front Immunol*. 2022;13:860915.
17. Dabiri M, Jehangir M, Khoshpouri P, Chalian H. Hypersensitivity Pneumonitis: A Pictorial Review Based on the New ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline for Radiologists and Pulmonologists. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(11).
18. Wollin L, Distler JHW, Redente EF, Riches DWH, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, et al. Potential of nintedanib in treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir J*. 2019;54(3).
19. Wuyts WA, Agostini C, Antoniou KM, Bouros D, Chambers RC, Cottin V, et al. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *Eur Respir J*. 2013;41(5):1207–18.
20. Bagnato G, Harari S. Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev*. 2015;24(135):102–14.
21. van den Bosch L, Luppi F, Ferrara G, Mura M. Immunomodulatory treatment of interstitial lung disease. *Ther Adv Respir Dis*. 2022;16:1753466622117002.
22. Honda K, Saraya T, Ishii H. A Real-World Prognosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Special Reference to the Role of Antifibrotic Agents for the Elderly. *J Clin Med*. 2023;12(10).
23. Glaspole I, Bonella F, Bargagli E, Glassberg MK, Caro F, Stansen W, et al. Efficacy and safety of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis who are elderly or have comorbidities. *Respir Res*. 2021;22(1):125.
24. Behr J, Prasse A, Kreuter M, Johow J, Rabe KF, Bonella F, et al. Pirfenidone in patients with progressive fibrotic interstitial lung diseases other than idiopathic pulmonary fibrosis (RELIEF): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med*. 2021;9(5):476–86.
25. Costabel U, Bonella F, Guzman J. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clin Chest Med*. 2012;33(1):151–63.
26. Mota PC, Soares ML, Vasconcelos CD, Ferreira AC, Lima BA, Manduchi E, et al. Predictive value of common genetic variants in idiopathic pulmonary fibrosis survival. *J Mol Med (Berl)*. 2022;100(9):1341–53.
27. Ley B, Collard HR. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol*. 2013;5:483–92.
28. Seibold MA, Smith RW, Urbanek C, Groshong SD, Cosgrove GP, Brown KK, et al. The idiopathic pulmonary fibrosis honeycomb cyst contains a mucociliary pseudostratified epithelium. *PLoS One*. 2013;8(3):e58658.
29. Evans CM, Fingerlin TE, Schwarz MI, Lynch D, Kurche J, Warg L, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Genetic Disease That Involves Mucociliary Dysfunction of the Peripheral Airways. *Physiological Reviews*. 2016;96(4):1567–91.
30. Kaur A, Mathai SK, Schwartz DA. Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:154.
31. Podolanczuk AJ, Wong AW, Saito S, Lasky JA, Ryerson CJ, Eickelberg O. Update in Interstitial Lung Disease 2020. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;203(11):1343–52.

32. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):788–824.
33. Sauleda J, Nunez B, Sala E, Soriano JB. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Natural History, Phenotypes. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(4).
34. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(5):e44–e68.
35. Esposito DB, Lanes S, Donneyong M, Holick CN, Lasky JA, Lederer D, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis in United States Automated Claims. Incidence, Prevalence, and Algorithm Validation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(10):1200–7.
36. Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*. 2018;378(19):1811–23.
37. Spagnolo P, Sverzellati N, Rossi G, Cavazza A, Tzouvelekis A, Crestani B, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: an update. *Ann Med*. 2015;47(1):15–27.
38. Santos V, Martins N, Sousa C, Jacob M, Padrao E, Melo N, et al. Hypersensitivity pneumonitis: Main features characterization in a Portuguese cohort. *Pulmonology*. 2020;26(3):130–7.
39. Wijsenbeek M, Suzuki A, Maher TM. Interstitial lung diseases. *Lancet*. 2022;400(10354):769–86.
40. Solaymani-Dodaran M, West J, Smith C, Hubbard R. Extrinsic allergic alveolitis: incidence and mortality in the general population. *QJM*. 2007;100(4):233–7.
41. Barber CM, Wiggins RE, Carder M, Agius R. Epidemiology of occupational hypersensitivity pneumonitis; reports from the SWORD scheme in the UK from 1996 to 2015. *Occup Environ Med*. 2017;74(7):528–30.
42. Nizri E, Irony-Tur-Sinai M, Lory O, Orr-Urtreger A, Lavi E, Brenner T. Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. 2009;183(10):6681–8.
43. Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(8):903–9.
44. Ohtsuka Y, Munakata M, Tanimura K, Ukita H, Kusaka H, Masaki Y, et al. Smoking Promotes Insidious and Chronic Farmer's Lung Disease and Deteriorates the Clinical Outcome. *Internal Medicine*. 1995;34.
45. Raghu G, Remy-Jardin M, Ryerson CJ, Myers JL, Kreuter M, Vasakova M, et al. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(3):e36–e69.
46. Blach J, Mackiewicz B. How much do we know about genetic predisposition of hypersensitivity pneumonitis? *Ann Agric Environ Med*. 2022;29(2):306–8.
47. Singh S, Collins BF, Sharma BB, Joshi JM, Talwar D, Katiyar S, et al. Interstitial Lung Disease in India. Results of a Prospective Registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(6):801–13.

48. Pereira CA, Gimenez A, Kuranishi L, Storrer K. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *J Asthma Allergy*. 2016;9:171-81.
49. Nogueira R, Melo N, Novais EBH, Martins N, Delgado L, Morais A, et al. Hypersensitivity pneumonitis: Antigen diversity and disease implications. *Pulmonology*. 2019;25(2):97-108.
50. Vasakova M, Selman M, Morell F, Sterclova M, Molina-Molina M, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: Current Concepts of Pathogenesis and Potential Targets for Treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(3):301-8.
51. Barrera L, Mendoza F, Zuniga J, Estrada A, Zamora AC, Melendro EI, et al. Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(1):44-55.
52. Barnes H, Troy L, Lee CT, Sperling A, Strek M, Glaspole I. Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Allergy*. 2022;77(2):442-53.
53. Miller R, Allen TC, Barrios RJ, Beasley MB, Burke L, Cagle PT, et al. Hypersensitivity Pneumonitis A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(1):120-6.
54. Ley B, Newton CA, Arnould I, Elicker BM, Henry TS, Vittinghoff E, et al. The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: an observational cohort-control study. *Lancet Respir Med*. 2017;5(8):639-47.
55. Lewandowska KB, Szturmowicz M, Lechowicz U, Franczuk M, Blasinska K, Falis M, et al. The Presence of T Allele (rs35705950) of the MUC5B Gene Predicts Lower Baseline Forced Vital Capacity and Its Subsequent Decline in Patients with Hypersensitivity Pneumonitis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(13).
56. Furusawa H, Peljto AL, Walts AD, Cardwell J, Molyneaux PL, Lee JS, et al. Common idiopathic pulmonary fibrosis risk variants are associated with hypersensitivity pneumonitis. *Thorax*. 2022;77(5):508-10.
57. Gally F, Sasse SK, Kurche JS, Gruca MA, Cardwell JH, Okamoto T, et al. The MUC5B-associated variant rs35705950 resides within an enhancer subject to lineage- and disease-dependent epigenetic remodeling. *JCI Insight*. 2021;6(2).

Anexos

Anexo I: Poster apresentado no I Congresso BioMedLab, março de 2023, Porto



UNVEILING COMMON MOLECULAR PATHWAYS LINKED TO ILDS WITH PROGRESSIVE FIBROSING PHENOTYPE: THE ROLE OF *MUC5B* PROMOTER VARIANT

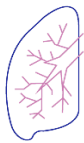
BioMedLab
ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE DOENÇAS RARAS E ORFÃS

10 a 12 Março 2023
Alfândega do Porto

RITA F. SANTOS^{1,2}, MELANY GONÇALVES^{1,2}, PATRÍCIA CAETANO MOTA^{3,4}, CATARINA GOUVEIA CARDOSO^{3,4}, ANDREIA L. COELHO^{1,5,6}, OKSANA SOKHATSKA^{3,7}, MARÍLIA BELTRÃO^{3,7}, SUSANA GUIMARÃES⁴, CONCEIÇÃO SOUTO MOURA⁴, LUÍS DELGADO^{3,4,7}, MIGUEL SOARES⁹, ANTÓNIO MORAIS^{3,4}, MARGARIDA SARAIVA¹ & HELDER NOVAIS-BASTOS^{1,3,4}

¹Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto, Porto, Portugal; ²Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal; ³Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal; ⁴Centro Hospitalar Universitário de São João, EPE, Porto, Portugal; ⁵Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), Porto, Portugal; ⁶Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto, Portugal; ⁷Basic&Clinical Immunology Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal; ⁸Laboratório de Apoio à Investigação em Medicina Molecular (LAuMM), Departamento de Biomedicina, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

INTRODUCTION

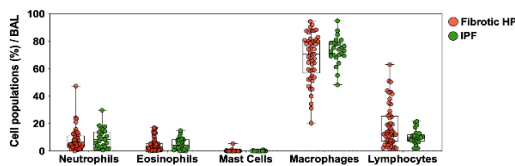


- Progressive fibrosing ILDs (PF-ILDs) comprise a heterogeneous group of lung disorders associated with high morbidity and mortality;
- Among PF-ILDs are **pulmonary fibrosis (IPF)** and **fibrotic hypersensitivity pneumonitis (HP)**, involving complex interactions between host genetics and different environmental triggers, shaping the immune milieu that ultimately drives the fibrotic cascade in a susceptible patient;
- The ***MUC5B* promoter variant rs35705950** is the common genetic variant associated with the greatest risk of developing IPF.

As IPF and fibrotic HP present phenotypic resemblances, we aim to analyze the role of rs35705950 *MUC5B* single nucleotide polymorphism (SNP) in both conditions, and to further understand a common pathology features.

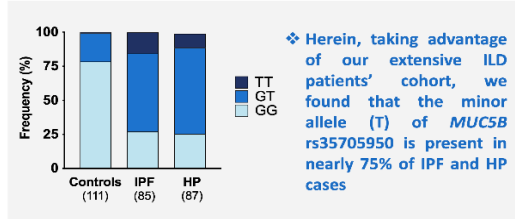
RESULTS

1. Analysis of immune cell populations in bronchoalveolar lavage of fibrotic HP and IPF patients



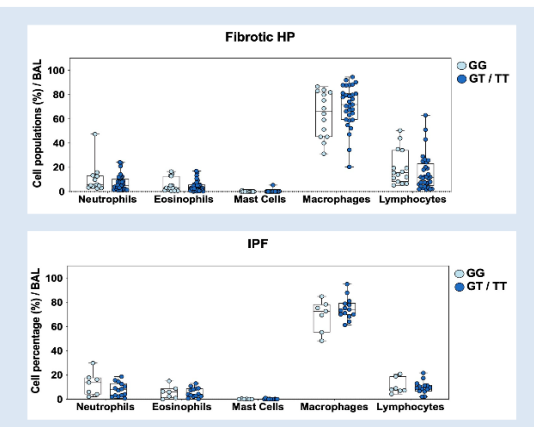
Overall, the immune cellular composition of the alveolar milieu in fibrotic HP cases resembles the ones with IPF

2. rs35705950 *MUC5B* SNP expression



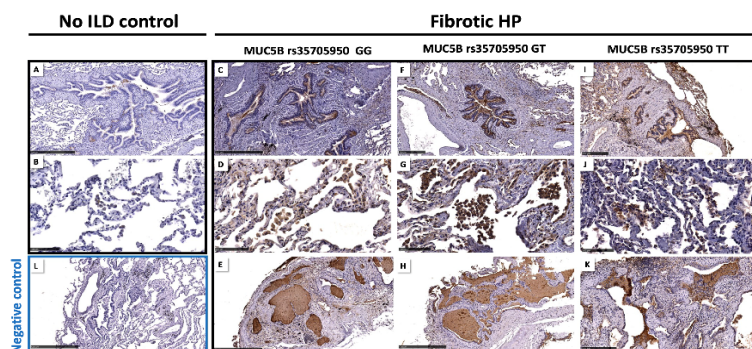
Herein, taking advantage of our extensive ILD patients' cohort, we found that the minor allele (T) of *MUC5B* rs35705950 is present in nearly 75% of IPF and HP cases

3. BAL immune cell populations distribution according to *MUC5B* rs35705950 genotype



MUC5B minor allele may be associated with lower BAL lymphocytes counts, and increased counts of macrophages

4. *MUC5B* localization and expression in lung tissue of fibrotic HP patients comparing to controls without interstitial lung disease



MUC5B immunohistochemical staining in individuals without interstitial lung disease showed weak expression both in the pulmonary epithelium (A) and in alveolar macrophages (B). Fibrotic HP patients were stratified according to *MUC5B* rs35705950 genotype (GG, GT and TT) and increased *MUC5B* expression was observed in the cytoplasm of the secretory cells (C), (F), (I) and alveolar macrophages (D), (G), (J). Regions of a dense accumulation of *MUC5B* were observed in areas of honeycomb cysts and mucous plugs (E), (H), (K). Negative control without primary antibody incubation is observed in (L).

CONCLUSIONS

- MUC5B* rs35705950 T allele is associated with pulmonary fibrosis in IPF and fibrotic HP cases in a Portuguese cohort, when compared with healthy controls, highlighting the hypothesis that PF-ILDs may share fibroproliferative common pathways;
- MUC5B* protein levels are increased in the pulmonary tissue of fibrotic HP patients.

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto «PTDC/MEC-RES/158/2020 e da bolsa atribuída pela fundação Amélia de Mello e D. José de Mello.

FCT
Fundação para a Ciência e a Tecnologia

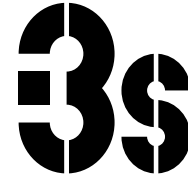
RSB
Rede de Saúde

SPP
Sociedade Portuguesa de Pneumologia

Anexo II: Poster apresentado na 16ª edição do Encontro de Investigação Jovem da U. Porto (IJUP), maio de 2023, Porto



UNVEILING COMMON MOLECULAR PATHWAYS LINKED TO ILDS WITH PROGRESSIVE FIBROSING PHENOTYPE: THE ROLE OF *MUC5B* PROMOTER VARIANT



Santos, Rita F.; Gonçalves, Melany; Mota, Patrícia C.; Cardoso, Catarina G.; Coelho, Andreia L.; Sokhatska, Oksana; Beltrão, Marília; Guimarães, Susana; Moura, Conceição S.; Delgado, Luís; Soares, Miguel; Morais, António; Saraiva, Margarida; Novais-Bastos, Helder

ana.faria@i3s.up.pt; melanyg@i3s.up.pt; patcmota@gmail.com; a.catarinagouveiacardoso@gmail.com; andreiac@i3s.up.pt; o.sokhatska@gmail.com; beltraomarilia@gmail.com; susana.melo.gui@gmail.com; moura.conceicao@gmail.com; ldelgado@med.up.pt; mlsoures@med.up.pt; antonio.morais16@outlook.com; margarida.saraiva@ibmc.up.pt; helder.bastos@chsjoao.min-saude.pt

INTRODUCTION

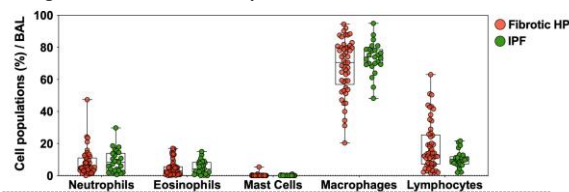


- Progressive fibrosing ILDs (PF-ILDs) comprise a heterogeneous group of lung disorders associated with high morbidity and mortality;
- Among PF-ILDs are **pulmonary fibrosis (IPF)** and **fibrotic hypersensitivity pneumonitis (HP)**, involving complex interactions between host genetics and different environmental triggers, shaping the immune milieu that ultimately drives the fibrotic cascade in a susceptible patient;
- The *MUC5B* promoter variant rs35705950 is the common genetic variant associated with the greatest risk of developing IPF.

As IPF and fibrotic HP present phenotypic resemblances, we aim to analyze the role of rs35705950 *MUC5B* single nucleotide polymorphism (SNP) in both conditions, and to further understand a common pathology features.

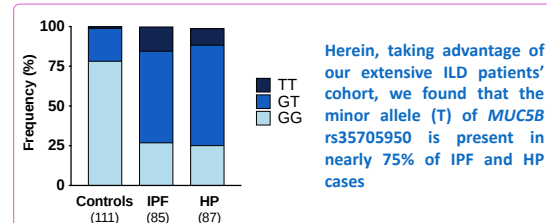
RESULTS

1. Analysis of immune cell populations in bronchoalveolar lavage of fibrotic HP and IPF patients



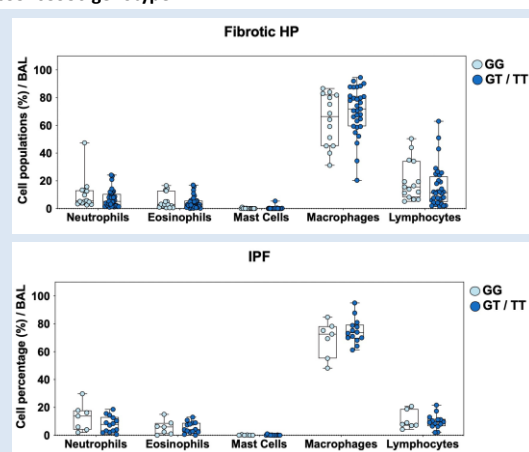
Overall, the immune cellular composition of the alveolar milieu in fibrotic HP cases resembles the ones with IPF

2. rs35705950 *MUC5B* SNP genotype



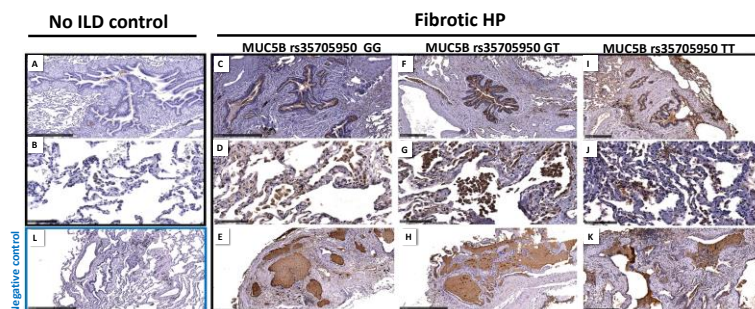
Herein, taking advantage of our extensive ILD patients' cohort, we found that the minor allele (T) of *MUC5B* rs35705950 is present in nearly 75% of IPF and HP cases

3. BAL immune cell populations distribution according to *MUC5B* rs35705950 genotype



MUC5B minor allele may be associated with lower BAL lymphocytes counts, and increased counts of macrophages

4. *MUC5B* localization and expression in lung tissue of fibrotic HP patients comparing to controls without interstitial lung disease



MUC5B immunohistochemical staining in individuals without interstitial lung disease showed weak expression both in the pulmonary epithelium (A) and in alveolar macrophages (B). Fibrotic HP patients were stratified according to *MUC5B* rs35705950 genotype (GG, GT and TT) and increased *MUC5B* expression was observed in the cytoplasm of the secretory cells (C), (F), (I) and alveolar macrophages (D), (G), (J). Regions of a dense accumulation of *MUC5B* were observed in areas of honeycomb cysts and mucous plugs (E), (H), (K). Negative control without primary antibody incubation is observed in (L).

CONCLUSIONS

- MUC5B* rs35705950 T allele is associated with pulmonary fibrosis in IPF and fibrotic HP cases in a Portuguese cohort, when compared with healthy controls, highlighting the hypothesis that PF-ILDs may share fibroproliferative common pathways;
- MUC5B* protein levels are increased in the pulmonary tissue of fibrotic HP patients.

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto «PTDC/MEC-RES/0158/2020 e da bolsa atribuída pela fundação Amélia de Mello e D. José de Mello.

